

Erstellung Rhizobium-spezifischer
in vitro-Systeme (S 30 und S 100)
zur zellfreien Expression von
Plasmid- und Bakteriophagen-DNA

von

Karin Laue-Schuler
aus Höxter

*Diss
Bielefeld
1985*

1985 # 436

**Erstellung Rhizobium-spezifischer
in vitro-Systeme (S 30 und S 100)
zur zellfreien Expression von
Plasmid- und Bakteriophagen-DNA**

**Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades**

vorgelegt von

**Karin Laue-Schuler
aus Höxter**

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 1985

Vorsitzender der Promotionskommission:

Professor Dr. K. Brodersen

Erstberichterstatte: Professor Dr. W. Lotz

Zweitberichterstatte: Professor Dr. E. Schweizer

Inhaltsverzeichnis

<u>A. Zusammenfassung</u>	1
<u>B. Einleitung</u>	4
<u>C. Material und Methoden</u>	9
1. Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide	9
1.1 Bakterienstämme	9
1.2 Bakteriophagen	9
1.3 Plasmide	9
2. Medien, Puffer, Enzyme, Chemikalien	10
2.1 Medien	10
2.1.1 Medien für die Anzucht von <u>Rhizobien</u>	10
2.1.2 Medien für die Anzucht von <u>E. coli</u>	11
2.2 Puffer und Lösungen	11
2.2.1 Puffer und Lösungen zur Isolierung der <u>in vitro</u> -Komponenten	11
2.2.2 Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	12
2.2.3 Andere Puffer	14
2.2.4 Zusammensetzung der Reaktionsmixe	14
2.2.5 Enzyme und Chemikalien	16
3. Bakterienanzucht	18
4. Phagenvermehrung	19
5. DNA-Isolierung	20
5.1 Plasmid-Isolierung	20
5.2 Phagen-DNA-Isolierung	21
5.3 DNA-Konzentrationsbestimmungen	21

6.	Isolierung der <u>in vitro</u> -Komponenten aus <u>R. leguminosarum</u> 300	21
6.1	S30-Präparation	22
6.2	S100- und Initiationsfaktoren-Präparation	23
6.3	Ribosomen-Präparation	24
6.4	RNA-Polymerase-Isolierung	25
6.5	Konzentrationsbestimmungen	25
7.	<u>in vitro</u> -Versuche	26
7.1	Transkriptionsversuche	26
7.2	Translationsversuche	27
7.3	Transkriptions-/Translationsversuche	27
7.3.1	S30- <u>in vitro</u> -Versuche	27
7.3.2	S100- <u>in vitro</u> -Versuche	28
8.	Analyse der <u>in vitro</u> -synthetisierten mRNA und Proteine	29
8.1	Bestimmung der in RNA oder Protein eingebauten Radioaktivität (TCA-fällbares Material)	29
8.2	Fluorographischer Nachweis <u>in vitro</u> -synthetisierter Proteine	29
8.3	Nachweis <u>in vitro</u> -synthetisierter Proteine durch ihre biologische Aktivität (Colizintropftests)	31
<u>D. Ergebnisse</u>		32
1.	Das S30-System von <u>R. leguminosarum</u> 300	32
1.1	Bestimmung der Proteinsyntheseaktivität und des Gehalts an endogener DNA in verschiedenen Reinigungsstufen des S30-Extrakts aus <u>R. leguminosarum</u> 300	32
1.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen für die <u>in vitro</u> -Proteinsynthese im S30-System aus <u>R. leguminosarum</u> 300	37

1.2.1	Abhängigkeit der Proteinsyntheseaktivität von der S30-Konzentration	37
1.2.2	Anhängigkeit der Proteinsyntheseaktivität von der Mg-Konzentration	37
1.2.3	Kinetik der <u>in vitro</u> -Proteinsynthese	37
1.2.4	Abhängigkeit der Proteinsyntheseaktivität von der Inkubationstemperatur	41
1.2.5	Abhängigkeit der Proteinsyntheseaktivität von der DNA-Konzentration	41
1.3	Anwendung des S30-Systems aus <u>R. leguminosarum</u> 300	44
1.3.1	Expression der <u>E. coli</u> -Plasmid-DNA Col E1 im S30-System aus <u>R. leguminosarum</u> 300	44
1.3.2	Expression der DNA des Phagen 11 aus <u>R. meliloti</u> 41 im S30-System aus <u>R. leguminosarum</u> 300	50
1.3.3	Expression der DNA des Phagen R14 aus <u>R. leguminosarum</u> 300 im S30-System aus <u>R. leguminosarum</u> 300	53
1.3.4	Verschiedene Plasmid-DNA's als Matrizen für das S30-System aus <u>R. leguminosarum</u> 300	60
2.	Das S100-System aus <u>R. leguminosarum</u> 300	61
2.1	Charakterisierung der Komponenten des S100-Systems	61
2.1.1	Fraktionierung des S30-Extrakts	61
2.1.2	Gelelektrophoretischer Vergleich der Komponenten der S100-Systeme von <u>R. leguminosarum</u> 300 und <u>E. coli</u>	65
2.1.3	Untersuchung der <u>in vitro</u> -Komponenten aus <u>R. leguminosarum</u> 300 auf ihren Protease- und Nukleasegehalt	67
2.2	<u>in vitro</u> -Versuche zur Bestimmung der Proteinsyntheseaktivität der einzelnen Komponenten des S100-Systems aus <u>R. leguminosarum</u> 300	67
2.2.1	Getrennte Transkription und Translation	68
2.2.1.1	Transkriptionsversuche	68
2.2.1.2	Translationsversuche in einem kombinierten <u>in vitro</u> -System aus <u>R. leguminosarum</u> - und <u>E. coli</u> -Komponenten	70

2.2.2	Gekoppelte Transkription und Translation in einem kombinierten <u>in vitro</u> -System aus <u>R. leguminosarum</u> - und <u>E. coli</u> -Komponenten	72
2.2.3	Isolierung aktiver S100-Enzymfraktionen	76
2.2.4	Optimierung des S100-Systems von <u>R. leguminosarum</u> 300	80
2.3	Expression von Plasmid- und Phagen-DNA im S100-System aus <u>R. leguminosarum</u> 300	86
2.3.1	Expression der Col E1-Plasmid-DNA im S100-System aus <u>R. leguminosarum</u> 300	86
2.3.2	Expression der DNA des Phagen R14 im S100-System aus <u>R. leguminosarum</u> 300	88
2.3.3	Verschiedene Plasmid- und Phagen-DNA's als Matrizen für das S100-System aus <u>R. leguminosarum</u> 300	91
<u>E. Diskussion</u>		92
1.	Eigenschaften der zellfreien Systeme aus <u>R. leguminosarum</u> 300	92
2.	Biosynthese von aktivem Colizin E1 in zellfreien Systemen aus <u>R. leguminosarum</u> 300	95
3.	Expression von <u>Rhizobium</u> -Phagen-DNA in zellfreien Systemen aus <u>R. leguminosarum</u> 300	98
3.1	DNA des Bakteriophagen 11 von <u>R. meliloti</u> 41	98
3.2	DNA des Bakteriophagen R14 von <u>R. leguminosarum</u> 300	99
4.	Expressionsbarrieren zwischen den <u>in vitro</u> -Systemen aus <u>E. coli</u> und <u>R. leguminosarum</u> 300	101
5.	Ausblick	105
<u>F. Literaturstellen</u>		107
Anhang: Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen		119

A. Zusammenfassung

Aus exponentiell wachsenden Rhizobium leguminosarum 300-Zellen wurden unterschiedlich gereinigte DNA-abhängige in vitro-Systeme zur zellfreien Proteinsynthese isoliert.

Das S30-System ist ein von Zellwand und Membranen befreiter Zellextrakt, der alle zur Transkription und Translation notwendigen Komponenten in einer Fraktion enthält. Supplementiert mit einem Reaktionsgemisch aus niedermolekularen Substanzen wie z.B. Nukleosidtriphosphaten und Aminosäuren, war das System in der Lage, eine zugegebene DNA als Matrize zu verwenden.

Das Temperaturoptimum des isolierten S30-Systems lag (in Gegenwart von 17 mM Mg^{2+}) bei 34°C. Durch Erhöhung der eingesetzten DNA-Konzentration (bis 9 µg DNA/100µl in vitro-Ansatz) ließ sich die Proteinsyntheseaktivität bis auf das fünffache gegenüber dem Leerwert ohne DNA steigern. Mit Col El-Plasmid-DNA als Matrize wurde das Bakteriozin Colizin El synthetisiert, dessen biologische Aktivität durch die bakterizide Wirkung auf einen sensitiven Indikatorstamm nachgewiesen wurde. Das Molekulargewicht des synthetisierten Polypeptids (54.000 D) stimmt gut mit Literaturwerten überein. Die im neuen S30-System aus R. leguminosarum 300 als Matrizen eingesetzten DNA's der Bakteriophagen R14 von R. leguminosarum 300 und ø11 von R. meliloti 41 kodierten für Polypeptide, deren Molekulargewichte mit denen gereinigter Phagenhüllproteine übereinstimmten. Bei Verwendung der DNA des Phagen 11 als Matrize wurden zwei Polypeptide mit den Molekulargewichten 83.000 und 29.500 D synthetisiert. Die Molekulargewichte der Strukturproteine betrugen 87.000, 71.000, 46.000 und 28.000 D. R14-DNA kodierte für zwei Proteine mit den Molekulargewichten 59.000 und 51.000 (im Vergleich dazu die Molekulargewichte der Strukturproteine: 61.000, 46.000 und 38.000 D).

Das erstellte S30-System diente als Ausgangspunkt für die Isolierung der Komponenten des S100-Systems in folgenden vier Fraktionen: DNA-abhängige RNA-Polymerase, Initiationsfaktoren, Ribosomen und eine S100-genannte Enzymfraktion. Anhand des Proteinmusters dieser Fraktionen wurde untersucht, inwieweit die Auftrennung vollständig war. Zur Aktivitätsbestimmung der S100-Komponenten aus R. leguminosarum 300 wurden sie mit den entsprechenden Komponenten aus E. coli in Transkriptions- und Translationsversuchen verglichen. Die RNA-Polymerase-Präparation aus R. leguminosarum 300 war im Transkriptionstest aktiv. Translationsversuche mit MS2-Phagen-RNA als Matrize bestätigten die Aktivität der Ribosomen- und Initiationsfaktor-Fraktionen. Für die Aktivität der S100-Fraktion war das Alter der Bakterienzellen entscheidend. Aktive Enzym-Fraktionen konnten nur aus logarithmischen Zellen, die nicht länger als drei Monate bei -20°C aufbewahrt worden waren, isoliert werden. Unter Standard-Reaktionsbedingungen konnte in keiner Fraktion des S100-Systems Nuklease- oder Proteaseaktivität festgestellt werden.

Das Temperaturoptimum des isolierten S100-Systems lag (in Gegenwart von 16-17 mM Mg^{2+}) bei 29°C. Die DNA-Abhängigkeit des S100-Systems wurde durch Zugabe steigender Konzentrationen an Col El-DNA demonstriert: 4 µg DNA/40 µl in vitro-Ansatz stimulierten den Einbau von ^{35}S -Methionin in TCA-fällbares Material auf ca. das vierfache des Leerwerts ohne DNA-Zugabe.

Als Matrizen wurde außer der Plasmid-DNA Col El aus E. coli die DNA des Phagen R14 von R. leguminosarum 300 verwendet. Auch im S100-System kodierte Col El-DNA für ein Polypeptid mit dem Molekulargewicht 54.000, das aufgrund seiner bakteriziden Aktivität als Colizin El identifiziert wurde. Mit

der DNA des Phagen R14 als Matrize synthetisierte das S100-System aus R. leguminosarum 300 zwei Polypeptide mit den Molekulargewichten 63.000 und 50.000 D. Diese Werte stimmen gut mit den Molekulargewichten der im S30-System synthetisierten, R14-spezifischen Polypeptide überein.

Demnach stehen nun sowohl ein S30-System als auch ein DNA-abhängiges S100-System für zukünftige in vitro-Analysen der Rhizobium-spezifischen Genexpression zur Verfügung.

B. Einleitung

In den frühen 60iger Jahren wurden erste Berichte über in vitro-Systeme zur zellfreien Proteinsynthese publiziert. So beschrieben Matthaei und Nirenberg (1961) ein RNA-abhängiges Translationssystem aus Escherichia coli. 1966 wurde das erste spezifische Protein von einer DNA-Matrize in vitro synthetisiert (Traub und Zillig, 1966). Seit 1967 gelingt die Synthese aktiver Enzyme in DNA-abhängigen in vitro-Systemen (Schweiger und Herrlich, 1974).

Das S30-System von Escherichia coli besteht aus einem Zell-extrakt, der durch eine 30.000xg-Zentrifugation von Zellwandbruchstücken und Membranen befreit wurde. Es enthält alle zur Transkription und Translation notwendigen Komponenten und zusätzlich viele mehr oder weniger gut definierte Bestandteile in einer Fraktion. Dieser Zellextrakt wird normalerweise präinkubiert, um die Konzentration an endogener mRNA zu verringern. Zusammen mit einem Reaktionsgemisch aus niedermolekularen Substanzen wie Nukleosidtriphosphaten, Aminosäuren, tRNA's usw. ist das System in der Lage, eine zugegebene DNA zu transkribieren und die gebildete mRNA zu translatieren (Modolell, 1971; Zubay, 1973).

Eine weitere Reinigung und Fraktionierung des S30-Extrakts führt zum S100-System. Es setzt sich im Wesentlichen aus den folgenden vier Komponenten zusammen: der DNA-abhängigen RNA-Polymerase, den Initiationsfaktoren, den Ribosomen und der S100-Enzymfraktion, die mittels einer Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose von Nukleinsäuren befreit wurde. Das S100-System ist daher DNA-abhängig und nutzt ausschließlich die zugegebene DNA als Matrize (Hayashi, 1971; Schweiger und Herrlich, 1974).

Während anfangs die Anwendung der in vitro-Systeme in der Aufklärung des genetischen Codes und der Grundmechanismen der Proteinsynthese bestand, liegt nun der Schwerpunkt bei Untersuchungen zur Regulation von Transkription und Translation und zur Bestimmung der Kodierkapazität klonierter Gene. Zur in vitro-Genkartierung können auch Minizellen (kleine, durch fehlerhafte Zellteilung zustandegekommene Tochterzellen, die keine chromosomale DNA mehr enthalten) verwendet werden (Reeve, 1979). Bei Regulationsstudien läßt sich jedoch die Wirkung von Effektoren nur schwer analysieren. Hier liegt ein wesentlicher Vorteil der zellfreien Systeme: Durch die Entfernung von Zellwand und Membranen sind die Transkriptions- und Translationsreaktionen frei zugänglich. Moleküle, die nicht die Membran passieren können, wie z. B. Proteine, DNA oder RNA können zugegeben oder entfernt werden. Ebenso können Faktoren aus anderen Organismen, Inhibitoren oder regulatorisch wirksame Substanzen wie z. B. cAMP oder ppGpp eingesetzt werden.

Die Proteinsynthese in gekoppelten Transkriptions-/Translationssystemen ist daher die geeignete Methode für in vitro-Genkartierungen und anschließende Regulationsstudien.

Zur Untersuchung der Rhizobium-spezifischen Genexpression wurde eine Cosmid-Genbank des Genoms von Rhizobium leguminosarum B10 (Tichy und Lotz, 1984) erstellt. Aus dieser Genbank wurden bereits mit Hilfe von DNA-DNA-Hybridisierungsmethoden Cosmid-Klone identifiziert, die Symbiose-spezifische DNA für die Nodulation von Leguminosen und für die Aufnahmehydrogenase von R. leguminosarum tragen (Richter, 1984). Diese Klone wurden dem Symbiose-Plasmid von R. leguminosarum B10 (Seifert et al., 1983) zugeordnet.

Es stellte sich nun die Frage, ob Rhizobium-spezifische Gene im in vitro-System aus E. coli exprimiert werden können. Das Problem der heterospezifischen Genexpression wurde in zahlreichen Arbeiten untersucht (Ehrlich und Sgaramella, 1978).

Das in RP4 klonierte Tryptophan-Operon aus E. coli wurde in verschiedene trp⁻-Mutanten von R. leguminosarum transferiert (Nagahari et al., 1979). Die Anwesenheit der E. coli-Gene in den R. leguminosarum-Zellen bewirkte eine Änderung des Phänotyps von Trp⁻ nach Trp⁺. Die trp-Gene aus Rhizobium meliloti waren dagegen nur in R. leguminosarum und Pseudomonas aeruginosa aktiv (Johnston et al., 1978); trp⁻-Mutanten von E. coli wurden nicht komplementiert.

Die Barrieren der heterospezifischen Genexpression können auf der Transkriptions- oder Translationsebene liegen.

Bei der Transkription wurden Unterschiede in der Promotor-spezifität der RNA-Polymerasen aus E. coli und dem gram⁺-Bakterium Bacillus subtilis nachgewiesen. Während E. coli-RNA-Polymerase sowohl die DNA des E. coli-Bakteriophagen T4 als auch die des B. subtilis-Phagen ϕ e transkribieren konnte (Shorestein und Losick, 1973), war B. subtilis-RNA-Polymerase sehr viel weniger aktiv mit der E. coli- als mit der B. subtilis-Phagen-DNA (Shorestein und Losick, 1973; Pène und Barrow-Carraway, 1972). RNA-Polymerase aus dem gram⁺Bakterium Streptomyces lividans konnte dagegen E. coli-Promotoren erkennen und nutzen (Jaurin und Cohen, 1973). Um zu prüfen, ob die Barriere der heterospezifischen Genexpression auf der Translationsebene liegt, wurde die in vitro-Translation bestimmter mRNA's mit Ribosomen aus verschiedenen Bakterienstämmen untersucht. Ribosomen der gram-negativen Bakterien E. coli und Pseudomonas fluorescens konnten mRNA aus gram⁻-Bakterien (mit Ausnahme von Azotobacter vinelandii) und gram⁺-Bakterien translatieren

(Stallcup et al., 1974). Ribosomen aus den gram-positiven Bakterien Clostridium pasteurianum, Streptococcus faecalis und E. subtilis waren dagegen nur in der Lage, mRNA aus gram⁺-Organismen zu translatieren.

Die RNA des Bakteriophagen MS2 von E. coli konnte dagegen von Ribosomen der gram⁻-Bakterien E. coli und Pseudomonas sp. und des gram⁺-Bakteriums Micrococcus cryophilus als Matrize verwendet werden (Szer und Brenowitz, 1970).

Um die beschriebenen Schwierigkeiten der heterospezifischen Genexpression zu vermeiden, wurde zur Untersuchung klonierter Rhizobium-DNA ein Rhizobium-spezifisches in vitro-System aufgebaut. Als Ausgangsstamm zur Isolierung der zellfreien Extrakte diente der Bakterienstamm R. leguminosarum 300 (Johnston und Beringer, 1975). Es handelt sich dabei um einen Wildtypstamm, der Erbsen effektiv nodulieren kann. R. leguminosarum 300 ist genetisch gut charakterisiert, die Lage vieler chromosomaler (Beringer et al., 1978) und Plasmid-kodierter Gene (Hirsch et al., 1980) ist bekannt.

Bisher wurde in der Literatur noch kein Rhizobium-spezifisches in vitro-System beschrieben. Aus den nahe verwandten Agrobakterien wurde dagegen bereits ein S30-System zur zellfreien Proteinsynthese isoliert, das in der Lage war, Ti-Plasmid-spezifische Proteine zu synthetisieren (Kartasova et al., 1981).

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Isolierung und Charakterisierung sowohl eines zellfreien S30-Systems als auch eines aus verschiedenen Komponenten zusammengesetzten S100-in vitro-Systems aus R. leguminosarum 300. Die Reinigung einer Komponente des S100-Systems, der RNA-Polymerase, wurde bereits publiziert (Lotz et al., 1981). Beide in vitro-Systeme wurden bezüglich ihrer Temperatur-, Inkubationszeit- und Magnesium-Konzentrationsabhängigkeit charakterisiert.

Die DNA-Abhängigkeit wurde an folgenden DNA-Matrizen demonstriert: der Plasmid-DNA Col E1 aus E. coli, den DNA's der Bakteriophagen R14 von R. leguminosarum 300 und ϕ 11 von R. meliloti 41. Hierbei wurde mit Col E1-DNA als Matrize ein biologisch aktives Colizin synthetisiert, dessen Molekulargewicht mit Literaturwerten übereinstimmte (Ebina et al., 1979). Die Molekulargewichte der R14- bzw. ϕ 11-spezifischen Polypeptide entsprachen denen gereinigter Phagenhüllproteine.

C . M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

1. Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

1.1 Bakterienstämme

<u>R. leguminosarum</u> 300	J. Beringer, Norwich
<u>E. coli</u> K12	Fa. Merck, Darmstadt
<u>E. coli</u> C600	Stammsammlung Labor Lotz
<u>R. meliloti</u> 41	T. Sik, Szeged

1.2 Bakteriophagen

R14 von <u>R. leguminosarum</u> 300	J. Beringer, Norwich
Ø 11 von <u>R. meliloti</u> 41	T. Sik, Szeged

1.3 Plasmide

Col E1	: Colizinproduktion, -Immunität	Stammsammlung Labor Lotz
pACYC 184	: Cm ^r , Tc ^r	A. Pühler, Bielefeld
pBR 322	: Ap ^r , Tc ^r	A. Pühler, Bielefeld
Col E1 lac	: Col E1 mit lac-Region aus <u>E. coli</u>	J. Collins, Braunschweig
pRmR2	: pACYC 184 mit 4 kb-Fragment aus der <u>R. meliloti</u> 2011- <u>nif</u> -Region	F. Ausubel, Boston
pSA 31	: pBR 322 mit 1,8 kb-Fragment aus der <u>K. pneumoniae</u> - <u>nif</u> -Region	F. Cannon, Brighton
pGV 0340	: pBR 322 mit Hind III-Fragmenten des Ti-Plasmids aus <u>A. tumefaciens</u> C 58	J. Schröder, Köln
pHU 1	: pLAFR 1 mit EcoRI-Fragment mit <u>hup</u> -spezifischer DNA aus <u>R. japonicum</u> 122 DES	H. Evans, Corvallis

2. Medien, Puffer, Enzyme, Chemikalien

2.1 Medien

2.1.1 Medien für die Anzucht von Rhizobien (Angaben für 1 Liter Medium)

TY : 5 g Trypton
3 g Hefeextrakt
1,3 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

B+Y : 14 g Mannit
10 μg Biotin
3 g Hefeextrakt
1 ml Spurenelementelösung
0,4 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$
1 g KH_2PO_4
0,55 g KNO_3
0,55 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
1,3 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

Die Spurenelementelösung enthält im Liter:

je 25 mg LiCl , KBr , KJ , SnCl_2 , ZnSO_4 , CuSO_4 , Na_2SO_4

je 50 mg $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, NiSO_4 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, TiO_2

350 mg MnCl_2

500 mg H_3BO_3

2.1.2 Medien für die Anzucht von E. coli (Angaben für 1 Liter Medium)

Penassay: 17,5 g Antibiotic Medium No. 3 (Assay Broth)
von Oxoid, Wesel

RGMC : 10 g Trypton
1 g Hefeextrakt
8 g NaCl
1 g Glucose
1 g $MgCl_2$
0,3 g $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$

Für Festmedien wird 15 g Agar/l, für Weichagar 6,5 g Agar/l
zugesezt.

2.2 Puffer und Lösungen

2.2.1 Puffer und Lösungen zur Isolierung der in vitro-Komponenten

Puffer A : 10 mM Tris-Acetat, pH 7,8
14 mM Mg-Acetat
60 mM K-Acetat
0,1 mM DTT

Puffer A + 0,26 M NH_4Cl

Puffer A + 0.3 M NH_4Cl

IF-Ribo-Puffer : 20 mM Tris-Acetat, pH 7,8
1 M NH_4Cl
30 mM Mg-Acetat
1 mM DTT

Nirenberg-Puffer : 10 mM Tris-Acetat, pH 7,5
10 mM Mg-Acetat
10 mM NH_4 -Acetat
3 mM DTT

TMNSH-Puffer : Nirenberg-Puffer + 10 % Glycerin

Elutionspuffer : 10 mM Tris-Acetat, pH 7,5
0,2 M K-Acetat
10 mM Mg-Acetat
5 mM DTT

2.2.2 Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Acrylamid-Stammlösung: 30 % Acrylamid + 0,8% N,N'-Methylen-bisacrylamid

Sammelgel-Puffer, 4x : 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 + 0,4 % SDS

Trenngel-Puffer, 4x : 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 + 0,4 % SDS

Ammoniumperoxodisulfat: 2 % in H_2O

Probenpuffer : 10 % Glycerin
5 % β -Mercaptoäthanol
3 % SDS
12,5 % Sammelgel-Puffer, 4x
0,005 % Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer : 25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 l % SDS

Färbelösung : 500 ml Methanol
 100 ml 96 % Essigsäure
 500 ml H₂O
 0,55 g Coomassie Brillant Blue R-250
 (= Serva Blau R)

Entfärbelösung : 7 % Essigsäure

Fluorographie-Fixierer : 50 g Trichloressigsäure
 100 ml 96 % Essigsäure
 200 ml Methanol
 auf 1 l mit Wasser auffüllen

Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele

Trenngel	10 %	12,5 %	15 %
Acrylamid-Stammlösung	8,3 ml	10,42 ml	12,5 ml
Trenngel-Puffer	6,3 ml	6,3 ml	6,3 ml
Ammoniumperoxodisulfat	0,38 ml	0,38 ml	0,38 ml
TEMED	6,3 µl	6,3 µl	6,3 µl
H ₂ O	10,0 ml	7,9 ml	5,85 ml

Sammelgel (für alle Gele gleich)

Acrylamid-Stammlösung	1,0 ml
Sammelgel-Puffer	2,5 ml
Ammoniumperoxodisulfat	0,15 ml
TEMED	10,0 µl
H ₂ O	6,3 ml

2.2.3 Andere Puffer

SM : 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
100 mM NaCl
10 mM MgSO₄

Agarosegelelektrophoresepuffer : 40 mM Tris-Acetat , pH 7,8
10 mM Na-Acetat
1 mM EDTA

2.2.4 Zusammensetzung der Reaktionsmixe

RM : Reaktionsmix für gekoppelte Transkription/
Translation (Strycharz und Nomura, 1978)

LM : Low molecular weight mix für gekoppelte Trans-
kription/Translation (Collins, 1979)

Polymix : Reaktionsmix für Translation (Jelenc und Kur-
land, 1979)

Transkriptions- : Reaktionsmix für Transkription (Lotz et al.,
mix 1981)

	RM	LM	Polymix	Transkriptions- mix
Tris-Acetat pH8	50 mM	77 mM	-	40 mM (Tris-HCl)
K-Acetat	50 mM	100 mM	95 mM (KCl)	-
Mg-Acetat	12 mM	15 mM	3 mM	5 mM (MgCl ₂)
DTT	1 mM	2,4 mM	1 mM	0,1 mM
ATP	2,2 mM	1,66 mM	2 mM	0,1 mM
GTP	0,55 mM	1 mM	0,5 mM	0,1 mM
CTP, UTP	je 0,55 mM	je 1 mM	-	je 0,1 mM
Phosphoenol- pyruvat	5 mM	37 mM	6 mM	-
Pyruvatkinase	0,75 Ein- heiten	-	1 µg	-
20 Aminosäuren	je 0,22 mM	je 480 µM	je 5 mM	-
tRNA	100 µg/ml	190 µg/ml	1-3 A ₂₆₀ - Einheiten	-
NH ₄ -Acetat	30 mM	50 mM	5 mM (NH ₄ Cl)	-
CaCl ₂	7.4 mM	13 mM (CaAc)	0,5 mM	-
cAMP	1 mM	88 µM	-	-
PEG 6000	-	2,6 %	-	-
K-Phosphatpuffer pH 7,6	-	-	5 mM	0,4 mM
NaCl	-	-	-	150 mM
EDTA	-	-	-	0,1 mM
Putrescin	-	-	8 mM	-
Spermidin	-	-	1,5 mM	-
FAD	27 µg/ml	-	-	-
NADP	27 µg/ml	-	-	-
Pyridoxin-HCl	27 µg/ml	-	-	-
p-Aminobenzoesäure	11 µg/ml	-	-	-
Folinsäure	27 µg/ml	-	-	-

2.2.5 Enzyme und Chemikalien

Bio Rad, München:

N,N'-Methylenbisacrylamid
Natriumdodecylsulfat
N,N,N',N'-Tetramethyläthyldiamin (TEMED)
Molekulargewichtsstandards für die SDS-PAGE
Biogel A-5m (200-400 mesh)
Protein Assay Kid

Boehringer, Mannheim:

Adenosin-5'-triphosphat (Dinatriumsalz)
Cytidin-5'-triphosphat (Dinatriumsalz)
Guanosin-5'-triphosphat (Dilithiumsalz)
Uridin-5'-triphosphat (Trinatriumsalz)
cAMP = Adenosin-3':5'-monophosphorsäure, zyklisch
FAD = Flavin-adenin-dinukleotid (Dinatriumsalz)
NADP = β -Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (Dinatriumsalz)
MS2-mRNA

Calbiochem GmbH, Gießen:

20 L-Aminosäuren
Phosphoenolpyruvat (Hexa- oder Heptahydrat, Trinatriumsalz)
tRNA = soluble RNA aus E. coli K12
Pyruvatkinase (3000 oder 5000 IU/ml in 3 M Ammoniumsulfat)

Serva, Heidelberg:

Acrylamid, 2x kristallisiert
Rinderserumalbumin
Alcoa A-305 (Aluminiumoxid)
Chloramphenicol

Lysozym

DNA aus Kälberthymus

Polyäthylenglykol (PEG) 6000

Hyflo Super Cel (Diatomeenerde)

Natriumdodecylsulfat

Triton X-100

Visking Dialysierschlauch

Coomassie Brilliant Blue (= Serva Blau R)

Sigma, München:

p-Aminobenzoesäure

DTT = D, L-Dithiothreitol (Cleland's Reagenz)

Folinsäure (Ca-Salz)

Pyridoxin-Monochlorid

Trizma Base

Sephadex 2B-300

Pharmacia, Freiburg:

Sephadex G-200

Whatman, England:

DEAE (= Diäthylaminoäthyl)-Cellulose DE 52

Glasfaserrundfilter GF/C 0 25 mm

3 M Papier

Amersham Buchler, Braunschweig:

L-³⁵S-Methionin (in 20 mM K-Acetat, 0,1 % 2-Mercaptoäthanol)

5,6-³H-Uridin-5'-triphosphat (Ammoniumsalz in 50 % Äthanol)

Amplify Autoradiographieverstärker

L-¹⁴C-Aminosäuremix in Wasser + 2 % Äthanol

New England Nuclear, Dreieich:

En³Hance Autoradiographieverstärker

Schleicher & Schüll, Dassel :

Membranfilter 0,45 um Porengröße, 0 25 mm

Kodak, USA:

X-Omat Röntgenfilme

Koch-Light Laboratories, England:

Scintimix 4

3. Bakterienanzucht

Zur Isolierung der in vitro-Komponenten wurden große Bakterienmengen benötigt. R. leguminosarum 300 wurde in B+Y-Medium im 70 l-Fermentor (Chemap AG, Zürich) unter Belüftung bei 29°C angezogen. Bei einem Titer von $2-5 \times 10^8$ Bakterien/ml wurden die Zellen geerntet. Zum schnellen Abkühlen der Zellen wurde der Fermenterinhalt in mit Eis gefüllte Plastikwannen abgelassen. Die Bakterien wurden mit einer Padberg-Durchflußzentrifuge sedimentiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt. Die Reinheit der Kultur wurde durch Plattierung auf selektive Medien und Phagentropftests überprüft. Die Ausbeute betrug 1-2 g Bakterienfeuchtmasse/1 Medium.

4. Phagenvermehrung (Sik, 1981)

Zur Herstellung hochtitriger Phagenlysate aus niedrigtitrigen Ausgangslysaten wurden 2-Schritt-Wuchskurven durchgeführt, d. h. es fanden zwei Phagenvermehrungszyklen statt. Eine Bakterienkultur (Titer: 2×10^8 Bakterien/ml) wurde mit Phagen bei einer Multiplizität (M) von 0,1 infiziert. Nach der ersten Phagenvermehrung (die Dauer entspricht einer Generationszeit der Bakterien) hatte sich der Bakterientiter verdoppelt und der Phagentiter war (bei einer Wurfgröße von 20 Phagen pro infiziertem Bakterium) auf das 20-fache gestiegen. Die zweite Phagenvermehrung erfolgte nun mit einer Multiplizität von 1, so daß der größte Teil der Bakterien infiziert wurde.

Das Ergebnis war eine 400-fache Anreicherung des Phagen.

2×10^8 Bakterien/ml und 2×10^7 Phagen/ml
(Multiplizität = 0,1)

1. Phagenvermehrung

4×10^8 Bakterien/ml und 4×10^8 Phagen/ml
(Multiplizität = 1)

2. Phagenvermehrung

8×10^9 Phagen/ml

Zur Identifizierung von Phagenproteinen in Infektionsgemischen wurden Einschrittwuchskurven ($M = 1$) verwendet.

Zur Reinigung der Phagenlysate von bakteriellen Zellwand- und Membranresten wurde Diatomeenerde (Serva Hyflo Super Cel) zugegeben. Nach einiger Zeit wurde das Lysat filtriert und niedrigtourig zentrifugiert (Sorvall SS 34, 10', 10.000 rpm).

Zur Darstellung der Phagenproteine und zur DNA-Isolierung benötigte man konzentrierte Phagenlysate. Die Phagen wurden daher einer hochtourigen Zentrifugation unterworfen (Kontron Ultrazentrifuge TGA-65, Rotor: 35, 2 h, 100.000xg, 4° C). Das Phagenpellet wurde in möglichst wenig SM-Puffer durch Stehenlassen über Nacht resuspendiert. Über einen CsCl-Gradienten konnten die Phagen weiter gereinigt werden. Die Ausgangsdichte des CsCl betrug 1,5. Nach der Zentrifugation (Kontron TGA-65, Rotor: 50 Ti, 20 h, 160.000xg, 20° C) wurde der Gradient ausgetropft. Die Phagenbande wurde durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm identifiziert. Bei mehr als 10^{11} Phagen war die Bande sichtbar und konnte mit einer Spritze durch seitliches Anstechen des Zentrifugenröhrchens abgezogen werden. Die Phagen wurden zur Entfernung des CsCl gegen SM-Puffer dialysiert.

5. DNA-Isolierung

5.1 Plasmid-Isolierung

Plasmide wurden nach den Anleitungen von Sidikaro & Nomura, 1975, Hansen & Olsen, 1978 oder Clewell & Helinski, 1969 mit anschließender CsCl-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Plasmidisolierung nach Clewell & Helinski wurde folgendermaßen modifiziert: als Detergenz wurde Triton X-100 anstelle von Brij 58 und Natriumdesoxycholat verwendet.

5.2 Phagen-DNA-Isolierung

Phagen-DNA wurde aus über Ultrazentrifugation konzentrierten Phagenlysaten durch mehrmaliges Phenolisieren extrahiert. Die DNA-enhaltenden wäßrigen Phasen wurden zur Entfernung des Phenols mit Äther ausgeschüttelt. Anschließend wurde die DNA mit Äthanol gefällt und in 10 mM Tris-Acetat pH 7,8 resuspendiert.

Eine DNase-/RNase-Behandlung des Phagenlysats vor der Phenolisierung zur Entfernung evtl. vorhandener bakterieller DNA oder RNA wurde nicht durchgeführt, da sich die Nukleasen anschließend nicht vollständig entfernen ließen und später im in vitro-System störten.

5.3 DNA-Konzentrationsbestimmungen

Die Konzentration isolierter Phagen- und Plasmid-DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm (OD_{260}) bestimmt ($OD_{260}=1 \hat{=} 50 \mu\text{g DNA/ml}$). Außerdem wurden die DNA-Präparationen durch Agarosegelelektrophorese (0,7% Agarose) auf ihre Kontamination mit chromosomaler DNA oder RNA getestet.

6. Isolierung der in vitro-Komponenten aus R. leguminosarum 300

Alle Schritte (bis auf die Präinkubation des S30-Extrakts) wurden bei 4° C durchgeführt. Die fertigen Präparationen wurden portionsweise abgefüllt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C aufbewahrt (besser wäre eine Lagerung bei -80°C). Die bei Zentrifugationsschritten angegebenen g-Zahlen beziehen sich auf die Mitte des Zentrifugationsröhrchens.

6.1 S30-Präparation (Zubay, 1973)

Die gefrorenen R. leguminosarum 300-Zellen wurden langsam bei 4°C aufgetaut, 1-2 mal mit Puffer A gewaschen und anschließend in 1,2 ml Puffer A/g Bakteriennaßgewicht aufgenommen. Die Zell-Lyse erfolgte durch Verreiben der Bakterien mit der doppelten Menge Aluminiumoxid oder 2-3 maliges Passieren durch die 'French Press' bei einem Druck von 8.400 psi. Die Zelltrümmer wurden durch zwei Zentrifugationen entfernt (Sorvall SS 34, 30', 15.500 rpm und 30', 20.000 rpm = 30.000xg). Es wurden jeweils nur die oberen 4/5 des Überstands verwendet, um möglichst wenig DNA im Zellextrakt zu behalten. Zur Entfernung von mRNA wurde der Zellextrakt mit allen zur Translation notwendigen Komponenten 80' bei 30°C präinkubiert.

Zusammensetzung des Präinkubationsmix:

Pyruvatkinase (10 mg/ml)	25	µl
2,2 M Tris-Acetat pH 8,2	1,0	ml
3 M Mg-Acetat	23	µl
38 mM ATP pH 7	2,63	ml
0,42 M Phosphoenolpyruvat pH 7	1,50	ml
0,55 M DTT	60	µl
20 Aminosäuren (je 50 mM)	6	µl
H ₂ O	2,25	ml
	7,5	ml

Die ATP- und Phosphoenolpyruvat-Lösungen wurden jedesmal frisch angesetzt. 7,5 ml Präinkubationsmix wurden für 25 ml S30-Extrakt benötigt. Der präinkubierte S30-Extrakt wurde gegen Puffer A dialysiert und in 500 µl-Portionen abgefüllt.

6.2 S100- und Initiationsfaktor-Präparation:

Die Zell-Lyse erfolgte wie bei 6.1 beschrieben. Die lysierten Bakterien wurden niedertourig zentrifugiert (Sorvall, SS34, 30' 14.000 rpm).

Durch eine Ultrazentrifugation wurde der Zellextrakt weiter fraktioniert. Der Überstand wurde über DEAE-Cellulose-Chromatographie gereinigt zur S100-DE-Fraktion, das Pellet (hauptsächlich Ribosomen) diente zur Isolierung der Initiationsfaktor-Fraktion.

Initiationsfaktor-Präparation (Traub et al., 1971)

Das Ribosomenpellet wurde sorgfältig von darüberliegenden DNA-Schichten gereinigt und in IF-Ribo-Puffer suspendiert. Durch die hohe Salzkonzentration (1 M NH_4Cl) wurden die Initiationsfaktoren von den Ribosomen abgelöst. Die Ribosomen wurden wieder sedimentiert (Kontron TGA-65, Rotor 60 Ti, 5 h, 250.000xg). Die Initiationsfaktoren befanden sich im Überstand, sie wurden durch Zugabe von Ammonsulfat (70 % Sättigung) gefällt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (Sorvall SS 34, 30', 13.000 rpm), in Puffer gelöst und dialysiert, bis kein Sulfat mehr nachweisbar war (IF-Fraktion). Zur weiteren Reinigung wurde die IF-Präparation auf eine DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Puffer A + 0,25 M NH_4Cl + 10% Glycerin. Die Fraktionen mit einer OD_{280} 3,0 wurden gesammelt und gegen Puffer A dialysiert. Die IF- und IF-DE-Fraktionen wurden in 50 μl -Fraktionen abgefüllt.

S100-Präparation

Die S100-DE-Fraktion wurde (mit Modifikationen) nach zwei verschiedenen Anleitungen isoliert.

A. Traub et al. (1971)

Die Bakterien wurden vor dem Zellaufschluß in Puffer A suspendiert. Der Zellextrakt wurde 5 1/2 h bei 250.000xg zentrifugiert (Kontron TGA-65). Die oberen 4/5 des Überstands wurden auf eine mit Puffer A äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule geladen. Es wurde solange mit Puffer A gewaschen, bis die OD_{280} des Eluates auf den ursprünglichen Wert gesunken war. Die Elution erfolgte mit Puffer A + 0,26 M NH_4Cl , die Fraktionen des Elutionsgipfels mit einer $OD_{280} > 3,0$ wurden vereinigt, gegen Puffer A dialysiert und in 100 μ l-Portionen abgefüllt.

B. Münch und Berg (1966)

Die Bakterien wurden in Nirenberg-Puffer suspendiert und nach der Zell-Lyse 1 h bei 10.000 rpm und 1h bei 20.000 rpm (Sorvall SS 34) zur Entfernung der Zelltrümmer zentrifugiert. Es schloß sich eine 100.000xg-Zentrifugation an (Kontron TGA-65, Rotor 50 Ti oder 60 Ti, 2 h). Der Überstand wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule geladen, die mit Elutionspuffer gewaschen wurde. Die OD_{280} des Eluates wurde gemessen, die Fraktionen des Gipfels vereinigt und das S100-Protein mit Ammonsulfat gefällt (100% Sättigung). Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (Sorvall SS 34, 50' 10.000 rpm), in TMNSH gelöst und solange gegen TMNSH dialysiert, bis kein Sulfat mehr nachweisbar war. Die S100-DE-Fraktion wurde in 100 μ l- und 200 μ l-Portionen abgefüllt

6.3 Ribosomenpräparation (Crawford und Gesteland, 1973)

Der Aufschluß der Bakterienzellen erfolgte wie bei 6.1 beschrieben. Die Zelltrümmer wurden durch zwei niedrigtourige Zentrifugationen (Sorvall SS 34, 20' und 1 h 13.000 rpm)

entfernt. Aus dem Überstand wurden die Ribosomen sedimentiert (Kontron TGA-65, Rotor 60Ti, 4h 100.000xg). Das Pellet wurde von den darüberliegenden Schichten gereinigt und in Puffer A + 0,3 M NH_4Cl resuspendiert. Die Ribosomen wurden ein zweites Mal sedimentiert, in Puffer A aufgenommen (0,04 ml/g Zellen), 2 h gegen Puffer A dialysiert und in 50 μl -Portionen abgefüllt.

6.4 RNA-Polymerase-Isolierung

Die RNA-Polymerase wurde wie bei Lotz et al. (1981) beschrieben isoliert.

6.5 Konzentrationsbestimmungen

Der Proteingehalt der S30-, S100- und Initiationsfaktor-Präparationen wurde mit der Methode von Lowry (1951) oder dem Biorad Protein Assay Kit gemessen. Die RNA-Polymerase-Konzentration wurde über die UV-Absorptionswerte A_{260} und A_{280} und die Gleichung

$$1,55 A_{280} - 0,76 A_{260} = \text{mg/ml Protein (Layne, 1957)}$$

bestimmt. Die Ribosomenkonzentration wurde in A_{260} -Einheiten/ml angegeben.

Es gilt dabei der Zusammenhang:

$$A_{260} \times 0,06 = \text{mg/ml Ribosomen (Moorman et al., 1967)}$$

Die in vitro-Komponenten aus E. coli wurden von Frau Hanne Wagner zur Verfügung gestellt (Wagner, 1982).

7. in vitro-Versuche

Die Komponenten des Mix wurden, sofern sie nicht autoklavierbar waren, mit sterilem Spatel abgewogen und in mit Diäthylpyrokarbonat behandeltem, bidestilliertem Wasser gelöst. Die Lösungen wurden bei -20°C aufbewahrt. Vor Versuchsbeginn wurde der Mix in der benötigten Menge zusammenpipettiert. Von den in vitro-Komponenten (außer der RNA-Polymerase, die in Glycerin-haltigem Puffer vorlag und bei -20°C nicht gefroren war) wurde für jeden Versuch eine neue Portion verwendet. Die Reste wurden verworfen, da die Aktivität durch das Auftauen und Einfrieren stark abnahm. Die in vitro-Ansätze wurden bei 0°C in der angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert. Die Zusammensetzung der Reaktionsmische wurde unter 2.4 beschrieben.

Die Volumenangaben für RNA-Polymerase, S100, Initiationsfaktoren, Ribosomen und S30 gelten für bestimmte Präparationen, für andere Präparationen müssen die Optima neu bestimmt werden. Der Reaktionsmix enthält immer einen Anteil Wasser, so daß bei der Variation der Volumina der in vitro-Komponenten immer ein kleiner Spielraum bleibt.

7.1 Transkriptionsversuche

Zusammensetzung eines in vitro-Transkriptionsansatzes:

RNA-Polymerase	5 μl
Mix	38,5 μl
^3H -UTP	1,5 μl (= 1,5 μCi)
DNA	5 μl (= 1-2 μg)
	50 μl

Inkubation 30' bei 31°C (R. leguminosarum 300-RNA-Polymerase)

7.2 Translationsversuche

Zusammensetzung eines in vitro-Translationsansatzes:

Polymix + Mg-Angleichlösung	25,7 µl
^{14}C -Aminosäuremix	3,0 µl (= 1,5 µCi)
Ribosomen	4,0 µl
S100	15,0 µl
Initiationsfaktoren	1,0 µl
MS2-RNA (= 0,3 OD ₂₆₀)	<u>1,3 µl</u>
	50,0 µl

Inkubation: 20' bei 37°C (E. coli-in vitro-Komponenten)
bzw. 30°C (R. leguminosarum-in vitro-Komponenten)

Die Mg-Konzentration wurde mit Hilfe einer 10 mM bzw. 100 mM Mg^{2+} -Lösung in jedem Ansatz exakt eingestellt, da sie, bedingt durch das Volumen der in vitro-Komponenten in Mg-haltigem Puffer, ständig variierte.

7.3 Transkriptions-/Translationsversuche

7.3.1 S30-in vitro-Versuche

Zusammensetzung eines Transkriptions-/Translationsansatzes:

LM-Mix	44,5 µl
S30	45 µl
^{35}S -Methionin	0,5 µl (= 5 µCi)
DNA (1,5 - 3 µg)	<u>10 µl</u>
	100 µl

Inkubation: 90' bei 34°C (bei Verwendung eines R. leguminosarum 300-S30-Extrakts).

7.3.2 S100-in vitro-Versuche

Zusammensetzung der Transkriptions-/Translationsansätze:

Angleichpuffer	2	µl	
RM (Reaktionsmix)	8	µl	
³⁵ S-Methionin	1	µl	(= 4 µCi)
Pyruvatkinase	0,15	µl	
S100	9,35	µl	
Initiationsfaktoren	5	µl	
Ribosomen	2,5	µl	
RNA-Polymerase	2	µl	
DNA (1,5 - 3 µg)	10	µl	
	40	µl	

LM (Reaktionsmix) +	11,5	µl	
Mg-Angleichlösung			
³⁵ S-Methionin	0,5	µl	(= 5 µCi)
Pyruvatkinase	0,15	µl	
S100	8,35	µl	
Initiationsfaktoren	5	µl	
Ribosomen	2,5	µl	
RNA-Polymerase	2	µl	
DNA (1,5 - 3 µg)	10	µl	
	40	µl	

Inkubation: 90' bei 29-30°C (bei Verwendung von R. legumi-
nosarum 300-in vitro-Komponenten).

Mit dem Angleichpuffer wurden die Tris-, Mg-, K-, NH₄- und DTT-Konzentrationen in jedem Ansatz auf definierte Werte eingestellt, da sie je nach der Menge der zugegebenen in vitro-Komponenten und ihrer Puffer unterschiedlich waren.

8. Analyse der in vitro-synthetisierten mRNA und Proteine

8.1 Bestimmung der in RNA oder Protein eingebauten Radioaktivität (TCA-fällbares Material)

Die eingebaute Radioaktivität ist ein Maß für die Aktivität des Systems. Die in vitro-Proben wurden im Ganzen (oder wenn sie für eine Fluorographie bestimmt waren, eine Probe von 5 μ l) mit 2ml kalter 5 %iger Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Mit TCA werden Nukleinsäuren und Proteine präzipitiert. Bei geringen Proteinmengen im Ansatz wurde zur quantitativen Fällung ein Tropfen 1 %ige Rinderserumalbuminlösung zugegeben. Zur Analyse der in Proteine eingebauten Radioaktivität wurde die Probe 15' auf 90°C erhitzt, dabei wurden Nukleinsäuren zerstört und tRNA's deacyliert.

Bei Transkriptionsversuchen wurde dieser Schritt weglassen. Das Präzipitat wurde auf Filter gesaugt und zur Entfernung der nicht eingebauten Radioaktivität mehrmals mit 5 %iger TCA gewaschen. Die getrockneten Filter wurden in Szintillationsgläsern mit 5 ml Toluol-Szintillationscocktail überführt und die Radioaktivität mit einem Kontron Betamatic Szintillationszähler bestimmt.

8.2 Fluorographischer Nachweis in vitro-synthetisierter Proteine

In vitro-synthetisierte, radioaktiv markierte Proteine können fluorographisch nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Bonner und Laskey, 1974). Bei Verwendung des RM-Mix konnten die in vitro-Ansätze direkt mit Probenpuffer versetzt werden. Mit LM inkubierte

Proben wurden mit ca. dem 10-fachen Volumen Aceton bei -20°C gefällt (Polysomen wurden vorher durch Zentrifugation entfernt, DNA durch Zugabe von DNase zerstört). Das Präzipitat wurde abzentrifugiert, unter Vakuum getrocknet und in Probenpuffer aufgenommen. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben 2' auf 90°C erhitzt.

In vitro-synthetisierte Polypeptide wurden mit 10, 12,5 oder 15 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Auf jedes Gel wurden zusätzlich Molekulargewichtsstandards aufgetragen, die nach der Elektrophorese abgeschnitten und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt wurden. Sie dienten der Erstellung einer Eichgeraden. Die Mobilität der Eichproteine (= Verhältnis von Wanderstrecke zu Gel-Länge) wurde gegen den Logarithmus der Molekulargewichte aufgetragen. Die Molekulargewichte der in vitro-synthetisierten Proteine konnten anhand ihrer Mobilität aus der Eichgeraden bestimmt werden. Die verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele waren 1,5 mm dick, das Trenngel hatte eine Länge von 10,4 cm. Die Laufbedingungen waren folgendermaßen: 30 mA für die Wanderung durch das Sammelgel (ca. 45 min), 60 mA im Trenngel (ca. 2 h). Bei Elektrophorese über Nacht (15-16 h) wurde eine konstante Stromstärke von 10 mA angelegt.

Zur Verstärkung der radioaktiven Strahlung wurde das Gel mit einem Autoradiographieverstärker nach Angabe der Herstellerfirma behandelt und anschließend auf Whatman 3 M-Papier getrocknet. In einer lichtdichten Kassette wurde ein Röntgenfilm auf das Gel gelegt. Die Expositionszeit (bei -20°C) richtete sich nach der pro Gel-Spur aufgetragenen Radioaktivität. Bei 20.000 cpm pro Spur betrug sie ca. 1-2 Wochen.

Die Zusammensetzung der Gele, die Elektrophoresebedingungen und die Molekulargewichtsbestimmung einzelner Banden waren bei der Auftrennung nicht radioaktiv markierter Proteine völlig identisch. Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (ca. 2 h) und mit 7 %iger Essigsäure entfärbt.

8.3 Nachweis in vitro-synthetisierter Proteine durch ihre biologische Aktivität (Colizintropftests)

In in vitro-Proben mit Col El-DNA als Matrize wird Colizin El synthetisiert (Eichenlaub, 1974).

Zum Colizinnachweis wurden mit der Weichagargußmethode Bakterienrasen von E. coli C600 (Colizin-sensitiv) und E. coli B 25 (Col El-tragender Stamm, Colizin-immun, diente als Kontrolle) angelegt. Es wurden 7×10^7 Bakterien pro Platte ausgegossen. Der in vitro-Ansatz wurde mehrmals auf die halbe Konzentration in Puffer A verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 5 μ l auf den C600-Rasen aufgetropft. Auf den Kontrollstamm B 25 wurde nur die unverdünnte Probe aufgetragen.

Der reziproke Wert der letzten Verdünnungsstufe des in vitro-Ansatzes, der einen klaren Hemmhof im Indikatorrasen hervorrief, wurde als Colizin-Konzentration (in relativen Einheiten) definiert (Eichenlaub, 1974).

D . E r g e b n i s s e

1. Das S30-System aus *R. leguminosarum* 300

1.1 Bestimmung der Proteinsyntheseaktivität und des Gehalts an endogener DNA in verschiedenen Reinigungsstufen des S30-Extrakts aus *R. leguminosarum* 300

Zur Isolierung eines S30-Extrakts wurden *R. leguminosarum* 300-Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase verwendet.

Nach dem mechanischen Zellaufschluß (durch Verreiben der Bakterien mit Aluminiumoxid oder durch mehrmaliges Passieren durch die 'French Press') wurden Zellwand- und Membrantrümmer durch eine 30.000xg-Zentrifugation entfernt. Die Bezeichnung 'S30' leitet sich von diesem Zentrifugationsschritt ab: Überstand (supernatant) der 30.000xg-Zentrifugation. Zur Verringerung des Gehalts an RNA, die im Zell-extrakt enthalten war, wurde eine Präinkubation durchgeführt. Anschließend wurde der fertige S30-Extrakt dialysiert.

Um zu prüfen, ob die Proteinsyntheseaktivität und der Gehalt an interner mRNA im Verlauf der Präparation abnahm, wurden von jeder Stufe der S30-Herstellung Proben einbehalten. Diese Proben wurden gegen Puffer A dialysiert und anschließend auf ihre Proteinsyntheseaktivität in in vitro-Transkriptions-/Translationsversuchen untersucht.

Die Col El Plasmid-DNA diente als Matrize. Sie kodiert u.a. für die Synthese des Bakteriozins Colizin El.

Die Aktivität des Systems wurde anhand der Synthese des Colizin-Proteins bestimmt. Dieses Protein läßt sich sowohl durch seine biologische Aktivität (Abb.1), als auch fluorographisch nachweisen.

Der unbehandelte S30-Extrakt aus R. leguminosarum 300 war um den Faktor 2 aktiver als der präinkubierte S30-Extrakt (Klarer Hemmhof im Indikatorrasen bis zur Verdünnungsstufe 1:40 statt 1:20). Unter den für den R. leguminosarum-Extrakt optimalen Bedingungen (Inkubation bei 34°C in Gegenwart von 17 mM Mg^{2+}) zeigte ein aus E. coli K 12 Zellen hergestellter Extrakt eine sehr geringe Aktivität (maximal 10 relative Colizineinheiten). Da die Proteinkonzentration des präinkubierten S30-Extrakts aus E. coli K 12 (15,5 mg/ml) mit der des Extrakts aus R. leguminosarum 300 (16,2 mg/ml) vergleichbar war, ließ sich die geringere Aktivität auf die für in vitro-Systeme aus E. coli ungünstigen Reaktionsbedingungen zurückführen; optimal wäre eine Inkubation bei 37°C mit einer Mg-Konzentration um 13 mM (Collins, 1979).

Der fluorographische Nachweis der in vitro-synthetisierten Proteine ließ zusätzlich eine Aussage über das Vorhandensein System-interner mRNA zu. Bei Abwesenheit von externer DNA im in vitro-Ansatz ('Leerwert') sollte im optimalen Fall keine Bande im Gel erscheinen.

Abbildung 2 zeigt ein Fluorogramm der im S30-System synthetisierten Polypeptide bei Verwendung von Col El-DNA als Matrize.

Die Intensität der Colizinbande war bei Verwendung des nicht-präinkubierten Extrakts am stärksten, wie aufgrund der Ergebnisse der Colizintropftests erwartet wurde. Der Leerwert war jedoch beim präinkubierten Extrakt niedriger, d.h. durch die Präinkubation nahm die Konzentration der internen mRNA deutlich ab. Bei normaler Belichtungszeit des Films wurden keine Banden beobachtet (Abb. 2).

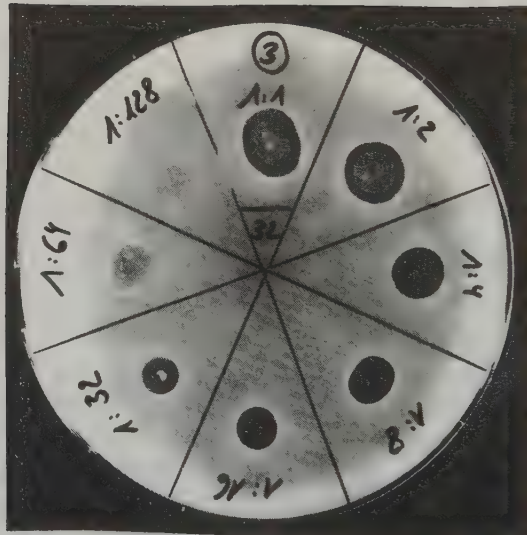


Abbildung 1

Verdünnungsstufen eines S30-in vitro-Ansatzes mit Col E1-DNA als Matrize, aufgetropft auf einen Colizin-sensitiven Indikatorrasen

(Der Colizingehalt der Probe beträgt 32 relative Einheiten.)

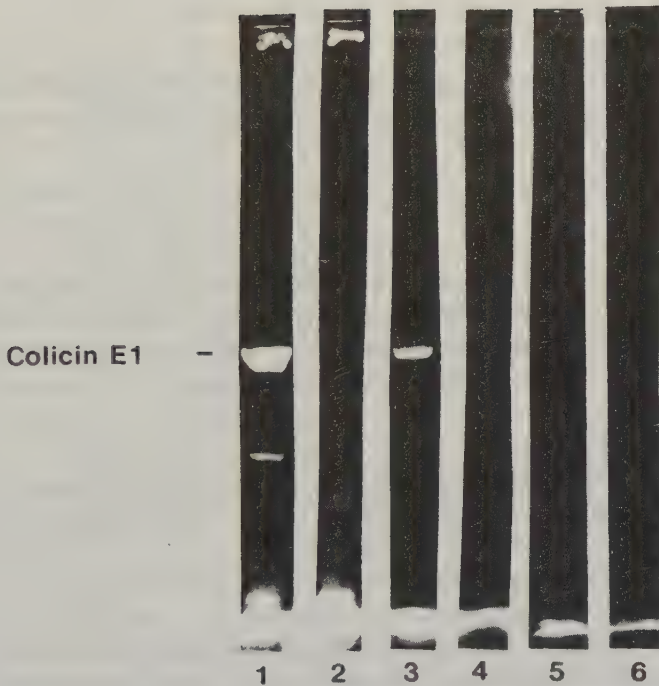


Abbildung 2

Col E1-DNA-abhängige in vitro-Proteinsynthese im S30-System
aus R. leguminosarum 300

Fluorogramm eines 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gels

- | | |
|--------|---|
| Spur 1 | nicht präinkubierter S30-Extrakt + Col E1-DNA |
| Spur 2 | nicht präinkubierter S30-Extrakt + Tris-Acetat-Puffer |
| Spur 3 | präinkubierter S30-Extrakt + Col E1-DNA |
| Spur 4 | präinkubierter S30-Extrakt + Tris-Acetat-Puffer |
| Spur 5 | nicht präinkubierter S30-Extrakt + Col E1-DNA +
Rifampicin |
| Spur 6 | nicht präinkubierter S30-Extrakt + Col E1-DNA +
Streptomycin |

Bei Zugabe von Rifampicin (Transkriptionshemmer) oder Streptomycin (Translationshemmer) in Konzentrationen von 4 µg/100 µl Synthesemix zum in vitro-Ansatz wurden keine Polypeptide synthetisiert (Abb. 2), obwohl ein relativ hoher Einbau von ³⁵S-Methionin in TCA-fällbares Material erfolgte (Tabelle 1).

Tabelle 1 Einfluß von Hemmern der Transkription (Rifampicin) und Translation (Streptomycin) auf die in vitro-Proteinsyntheseaktivität im S30-System
(Bestimmung der in TCA-fällbares Material eingelaufenen Radioaktivität)

S30-System	54.889 cpm	100%
S30-System + Rifampicin	13.500 cpm	25%
S30-System + Streptomycin	12.800 cpm	23%
S30-System + Rifampicin + Streptomycin	17.900 cpm	33%

Die Ursache des relativ hohen Einbaus in Gegenwart von Rifampicin und Streptomycin ist unbekannt. Durch die hohe Proteinkonzentration in S30-in vitro-Versuchen ist es möglich, daß uneingebautes ³⁵S-Methionin im TCA-Präzipitat festgehalten wurde und durch Waschen des Nitrozellulosefilters nicht quantitativ entfernt werden konnte. Eine andere Erklärung wäre eine unspezifische Polymerisation von ³⁵S-Methionin.

Aus der Literatur ist bekannt, daß auch ohne zugegebene Matrize Aminosäuren in niedermolekulare Proteinfragmente eingebaut werden (Herrlich und Schweiger, 1974). Kaltschmidt et al. (1974) berichteten, daß ca. 10% des ³⁵S-Methionin-Einbaus DNA-unabhängig sind.

In den folgenden Versuchen wurde für Fluorographien der präinkubierte S30-Extrakt (=pS30) verwendet, für Colizintropftests dagegen der unbehandelte S30-Extrakt.

1.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen für die in vitro-Proteinsynthese im S30-System aus R. leguminosarum 300

1.2.1 Abhängigkeit der Proteinsyntheseaktivität von der S30-Konzentration

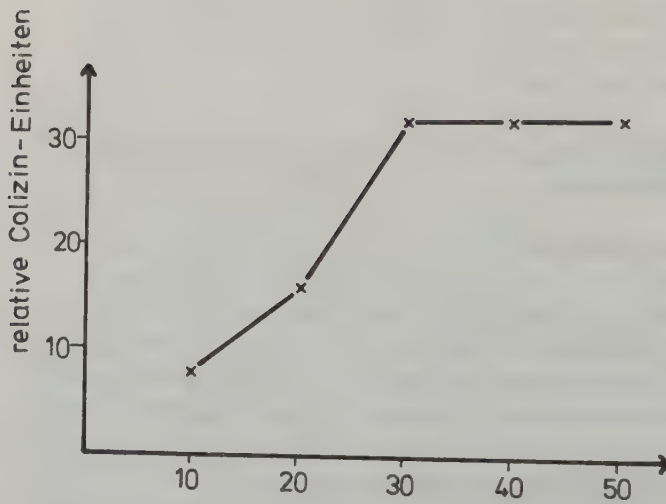
Im R. leguminosarum-S30-System nahm die in vitro-Proteinsyntheserate mit dem Volumen an eingesetztem S30-Extrakt zu. Höhere Konzentrationen als 7,5 mg Protein/ml Synthesegemisch wirkten sich jedoch nicht mehr stimulierend auf die Proteinsynthese aus (Abb. 3).

1.2.2 Abhängigkeit der Proteinsyntheseaktivität von der Mg-Konzentration

Die Mg-Konzentration im in vitro-Ansatz wurde von 5 bis 20 mM variiert (Abb. 4). Als Matrize wurde die DNA des Phagen R14 von R. leguminosarum 300 verwendet. Die Zugabe von $MgAc_2$ erfolgte unter Berücksichtigung der Mg-Konzentration, die durch den S30-Puffer A bereits im Ansatz vorhanden war. Die optimale Mg-Konzentration lag bei 17 mM.

1.2.3 Kinetik der in vitro-Proteinsynthese

Zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit wurden identische, Col El-DNA enthaltende Proben angesetzt, deren Gehalt an synthetisiertem Colizinprotein in 10 min-Abständen bestimmt wurde (Abb. 5). Bis zu einer Inkubationszeit von 90 min nahm die Konzentration an synthetisiertem Colizin linear zu und blieb danach über einen Zeitraum von einer Stunde konstant. Für die folgenden Versuchen wurde daher eine Inkubationszeit von 90 min gewählt.



µl S30-Extrakt / 100µl iv-Ansatz

Abbildung 3

Abhängigkeit der in vitro-Proteinsynthese von der S30-Konzentration im zellfreien System von *R. leguminosarum* 300

(Col E1-DNA als Matrize)

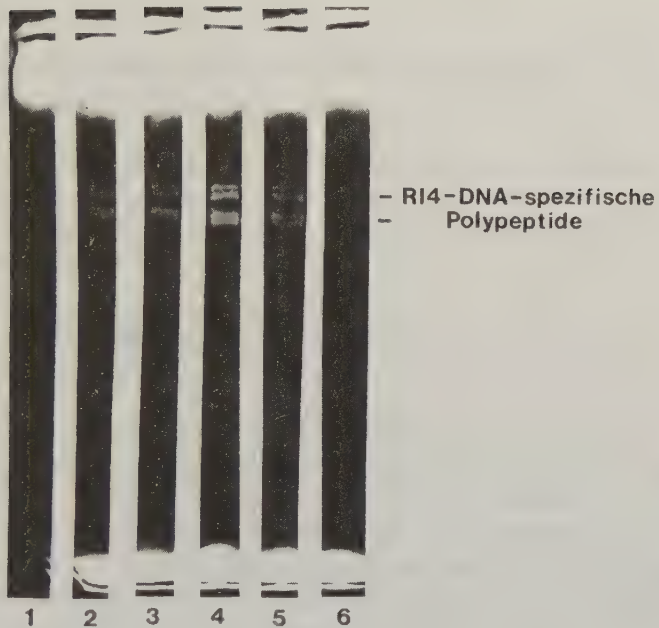


Abbildung 4

Abhängigkeit der in vitro-Proteinsynthese im S30-System aus R. leguminosarum 300 von der Mg^{2+} -Konzentration
Fluorogramm eines 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gels
(R14-DNA als Matrizze)

Spur 1	S30-Extrakt + R14-DNA	(7 mM Mg^{2+})
Spur 2	S30-Extrakt + R14-DNA	(10 mM Mg^{2+})
Spur 3	S30-Extrakt + R14-DNA	(13 mM Mg^{2+})
Spur 4	S30-Extrakt + R14-DNA	(16 mM Mg^{2+})
Spur 5	S30-Extrakt + R14-DNA	(19 mM Mg^{2+})
Spur 6.	S30-Extrakt + Tris-Acetat-	(13 mM Mg^{2+})
	Puffer	

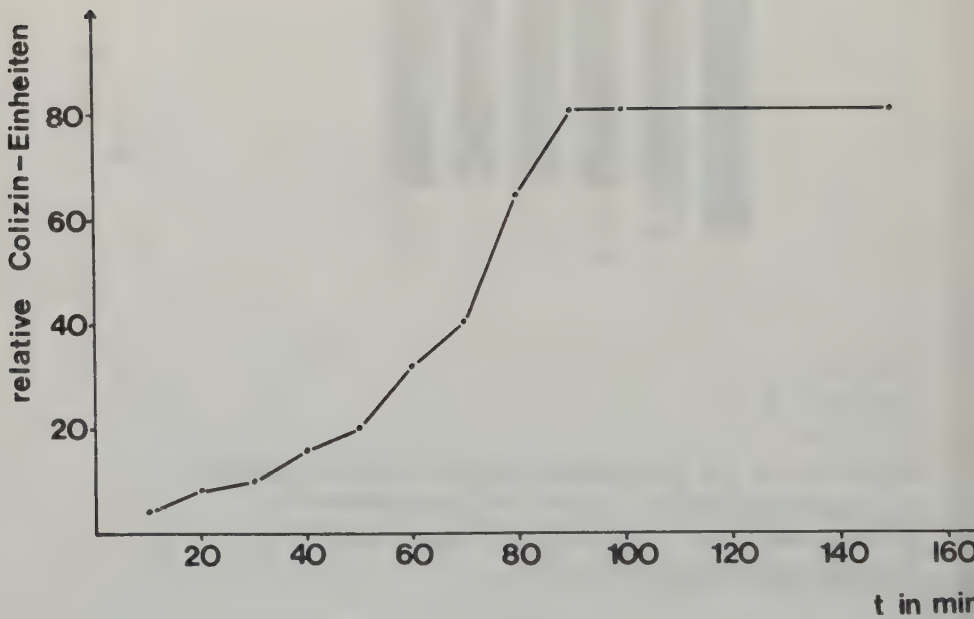


Abbildung 5

Abhängigkeit der in vitro-Proteinsynthese im S30-System aus
R. leguminosarum 300 von der Inkubationszeit

(Col E1-DNA als Matrize)

1.2.4 Abhängigkeit der Proteinsyntheseaktivität von der Inkubationstemperatur

Die optimale Inkubationstemperatur, gemessen an der Konzentration in vitro-synthetisierten Colizins, lag bei 34°C. Die Proteinsyntheseaktivität wurde bei folgenden Temperaturen bestimmt: 24°, 29°, 34° und 39°C (Abb. 6).

1.2.5 Abhängigkeit der Proteinsyntheseaktivität von der DNA-Konzentration

Um zu bestimmen, bis zu welcher Proteinsyntheseaktivität sich das S30-System aus R. leguminosarum stimulieren ließ, wurden steigende Konzentrationen an Col El-DNA, maximal 9 µg/100 µl in vitro-Ansatz zugegeben (Abb. 7). Normalerweise wurden ca. 1-2 µg DNA/100 µl in vitro-Ansatz eingesetzt. Es zeigte sich, daß die Menge an in vitro-synthetisiertem Colizin mit steigender DNA-Konzentration zunahm. Bei 9 µg DNA/100 µl in vitro-Ansatz wurden 300 relative Colizineinheiten synthetisiert. Höhere DNA-Konzentrationen wurden nicht geprüft. Der lineare Anstieg der Kurve zeigt, daß die Kapazität des Systems noch nicht erschöpft war, und somit kein Mangel an Mix-Komponenten (z.B. Nucleosidtriphosphaten oder Aminosäuren) bestand.

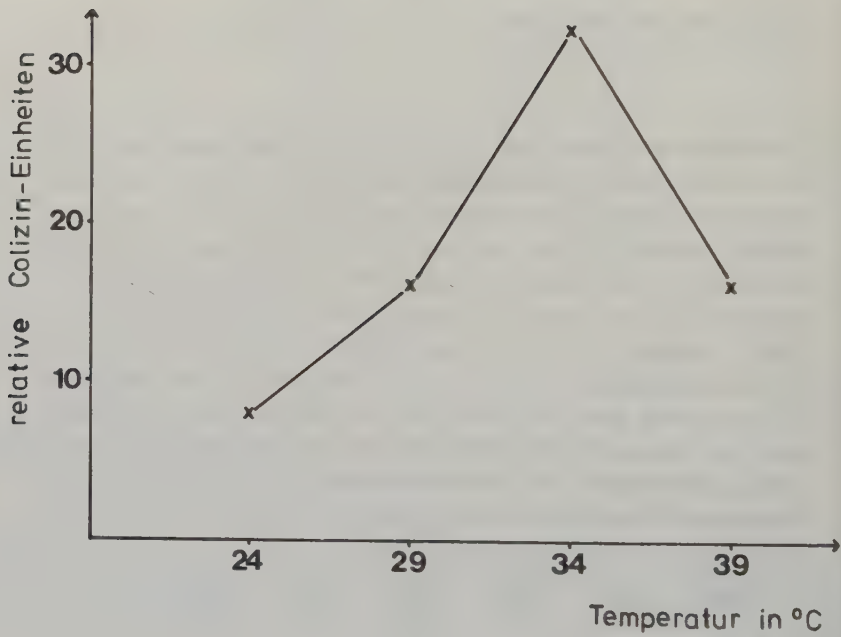


Abbildung 6

Abhängigkeit der in vitro-Proteinsynthese im S30-System aus R. leguminosarum 300 von der Inkubationstemperatur

(Col El-DNA als Matrize)

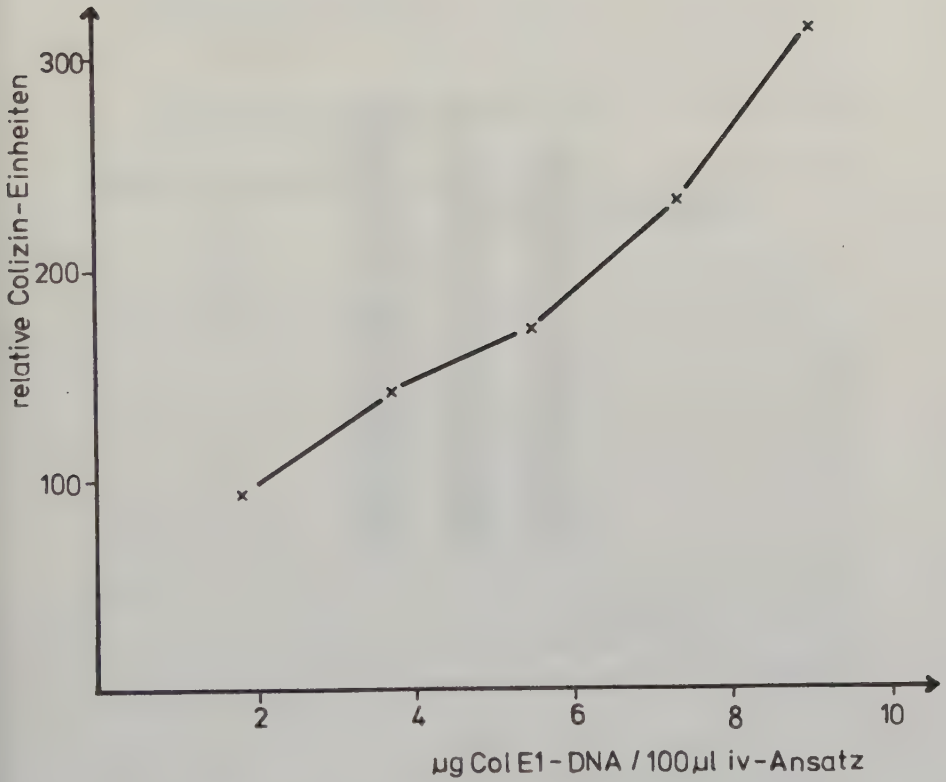


Abbildung 7

Abhängigkeit der in vitro-Proteinsynthese im S30-System aus R. leguminosarum 300 von der DNA-Konzentration

(Col E1-DNA als Matrize)

1.3 Anwendung des S30-Systems aus *R. leguminosarum* 300

Um zu prüfen, ob die S30-synthetisierten Polypeptide mit den entsprechenden in vivo gebildeten Proteinen übereinstimmen, wurden drei verschiedene DNA-Matrizen im S30-System eingesetzt.

Abb. 8 zeigt ein Agarose-Gel der DNA-Präparationen.

1.3.1 Expression der Col El-Plasmid-DNA im S30-System aus *R. leguminosarum* 300

Das Plasmid Col El aus *E. coli* hat eine Länge von 2,1 μm = 6,3 kb. Es ist chloramphenicolverstärkbar und läßt sich daher relativ leicht in hohen Konzentrationen isolieren. Abb. 9 zeigt die Genkarte des Plasmids Col El.

Das Plasmid kodiert für drei Proteine: das Bakteriozin Colizin El mit einem Molekulargewicht von 58.000 D, ein Immunitätsprotein (MW 14.000 D), das dem Bakteriozinproduzenten Immunität gegen sein eigenes Bakteriozin verleiht, sowie das Genprodukt der mob-Region (MW 62.000 D) (Veltkamp und Stuitje, 1981). Die Genexpression des Plasmids in in vitro-Systemen von *E. coli* wurde bereits ausführlich in der Literatur beschrieben (Ebina et al. 1979; Eichenlaub, 1974; Chen und Zubay, 1983; Collins et al., 1978; Yang und Zubay, 1978).



Abbildung 8

Gelelektrophoretische Darstellung (0,7 % Agarose) der als Matrizen für das in vitro-System aus R. leguminosarum 300 verwendeten DNA-Präparationen

- Spur 1 Col E1-Plasmid-DNA aus E. coli
Spur 2 DNA des Phagen 11 von R. meliloti 41
Spur 3 DNA des Phagen R14 von R. leguminosarum 300

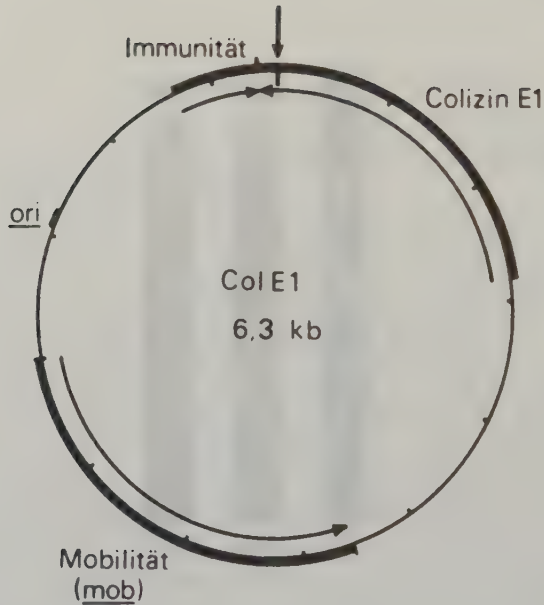


Abbildung 9

Genkarte des Plasmids Col E1

Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtungen an, die Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoRI ($\downarrow$) und der Startpunkt der Replikation (ori) sind eingezeichnet (Veltkamp und Stuitje, 1981).

Das Plasmid eignet sich als Matrize für das S30-System aus R. leguminosarum 300, da auch hier in vitro biologisch aktives Colizin synthetisiert wurde (siehe 1.1). Der Nachweis erfolgte durch Auftropfen des Proteinsynthesegemisches auf einen Colizin-sensitiven Indikatorrasen (Abb. 1). Bei genügend hoher Colizinkonzentration bilden sich klare Hemmhöfe im Bakterienrasen. Das Wachstum Col El-tragender (= immuner) Bakterien wurde hiervon jedoch nicht beeinflusst. In vitro-Ansätze ohne Col El-DNA erzeugten keine Hemmhöfe.

Bei Anwesenheit von ^{35}S -Methionin im in vitro-Ansatz werden neu-synthetisierte Proteine radioaktiv markiert. Sie können, nachdem sie im SDS-Polyacrylamid-Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt worden sind, fluorographisch nachgewiesen werden.

Abb. 10 zeigt ein Fluorogramm der Col El-kodierten, in vitro-synthetisierten Polypeptide. Die Hauptbande stellt das Colizin dar.

Exakte Berechnungen des Molekulargewichts des Bande gestalteten sich schwierig, da im Versuchsansatz PEG 6000 vorhanden war, das sich auf die Wanderstrecke von Proteinen im SDS-Polyacrylamid-Gel drastisch auswirkte (Ehring, 1983). Die Berechnungen der Molekulargewichte der Banden lieferten in Anwesenheit von PEG 6000 immer zu geringe Werte, wie durch vergleichende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinmischungen in Gegenwart und in Abwesenheit von PEG 6000 gezeigt werden konnte. Im oberen Bereich des 10% igen Acrylamid-Gels differierten die berechneten Molekulargewichte identischer Proteinbanden um 10.000 - 15.000 D, im mittleren Bereich um 2.000 - 3.000 D, je nachdem, ob die Probe PEG 6000 in der im LM-Reaktionsmix üblichen Konzentration enthielt oder nicht. In späteren Versuchen wurden daher die in vitro-Proben zur Entfernung des PEG 6000 einer Acetonfällung unterworfen, bevor sie elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Das Molekulargewicht der Colizinbande betrug 54.000 D.

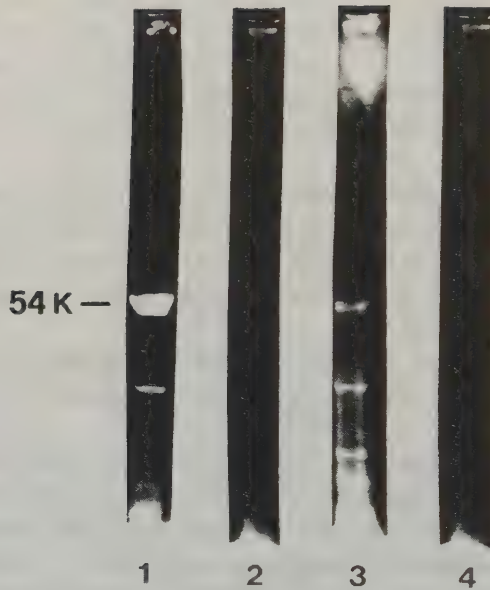


Abbildung 10

Col E1-DNA-abhängige in vitro-Proteinsynthese
Fluorogramm eines 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gels

- | | | |
|--------|---|----------------------|
| Spur 1 | S30-Extrakt aus <u>R. leguminosarum</u> 300 | + Col E1-DNA |
| Spur 2 | S30-Extrakt aus <u>R. leguminosarum</u> 300 | + Tris-Acetat-Puffer |
| Spur 3 | S30-Extrakt aus <u>E. coli</u> | + Col E1-DNA |
| Spur 4 | S30-Extrakt aus <u>E. coli</u> | + Tris-Acetat-Puffer |

Abbildung 10 zeigt außerdem die in einem S30-System aus E. coli synthetisierten, Col El-kodierten Polypeptide. Dabei zeigte sich, daß die beiden Colizin-Banden eine identische Wanderstrecke im Gel zurücklegten. Das im Rhizobium-spezifischen S30-System synthetisierte Polypeptid entsprach somit biologisch und elektrophoretisch dem Colizin El des E. coli-spezifischen S30-Systems. Wie bereits unter 1.1 erwähnt, war die Aktivität des in vitro-Systems aus E. coli, gemessen an der biologischen Aktivität des in vitro-synthetisierten Colizins, geringer als die des S30-Systems aus R. leguminosarum 300. Entsprechend hatte bei der Col El-DNA-abhängigen in vitro-Proteinsynthese im E. coli-System die Bande, die dem Colizin-Protein entsprach, eine geringere Intensität. Verglichen mit den im S30-System aus R. leguminosarum 300 synthetisierten Polypeptiden fiel die stärkere Synthese niedermolekularer Proteine im E. coli-spezifischen System auf.

1.3.2 Expression der DNA des Phagen 11 aus E. meliloti 41 im S30-System aus R. leguminosarum 300

Der Phage 11 von R. meliloti 41 ist ein allgemein transduzierender Phage. Seine Nukleinsäure besteht aus doppelsträngiger DNA mit einer Größe von 41 MD $\approx$ 64,5 kb (Sik et al., 1980). Ein anderer, spezifisch transduzierender Bakteriophage von R. meliloti 41, Phage 16-3, ist eng mit ϕ 11 verwandt (Mink et al., 1982). Aufgrund der hohen Homologie der 16-3- und ϕ 11-DNA kann man annehmen, daß sich die beiden Phagen auch in ihren Strukturproteinen nur wenig unterscheiden. Die Strukturproteine des Phagen 16-3 wurden ausführlich analysiert (Erdei et al., 1982).

Die DNA des Phagen 11 wurde durch Phenolbehandlung eines hochtitrigen Phagenlysats isoliert. Restriktionsspaltungen der DNA mit dem Enzym Bam HI ergaben das in der Literatur beschriebene Bandenmuster (Mink et al., 1982). Die Expression der Phagen-11-DNA im S30-System aus R. leguminosarum 300 wurde untersucht (Abb. 11). Hierbei wurden durch die fluorographische Analyse der synthetisierten Polypeptide zwei prominente Banden mit den Molekulargewichten 83.000 D und 29.500 D nachgewiesen. (Das Auftreten von Doppelbanden ist ein Gelartefakt.)

Um Hinweise auf die Identität der in vitro-synthetisierten Polypeptide zu bekommen, wurden komplette Phagen mit SDS denaturiert und ihre Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Es ergaben sich vier Banden mit den Molekulargewichten 87.000, 71.000, 46.000 und 28.000 D (Abb. 12). Die Bestimmung der hochmolekularen Banden war problematisch, da im oberen Teil des Gels sehr geringe Unterschiede in der Wanderstrecke bereits große Änderungen im Molekulargewicht bewirkten.

Eine genaue Zuordnung der in vitro-synthetisierten Polypeptide zu den Strukturproteinen des Phagen 11 könnte immunologisch erfolgen.

In der Literatur wurden folgende Molekulargewichte der Strukturproteine des nahe verwandten Phagen 16-3 angegeben: 86.000, 72.000, 47.000, 31.500 und 18.500 D (siehe Tabelle 2). Bei den ersten beiden Proteinen handelt es sich um Schwanz-, bei den folgenden um Kopfproteine (Erdei et al., 1982).

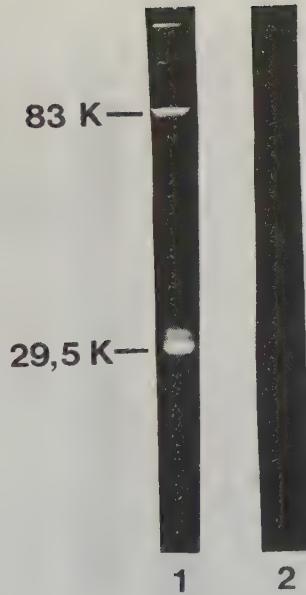


Abbildung 11

ϕ 11-DNA-abhängige in vitro-Proteinsynthese im S30-System
aus R. leguminosarum 300
Fluorogramm eines 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gels

Spur 1 S30-Extrakt + ϕ -11-DNA
Spur 2 S30-Extrakt + Tris-Acetat-Puffer

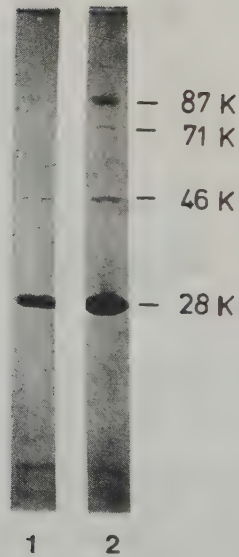


Abbildung 12

Darstellung der Strukturproteine des Phagen 11 von R. meliloti 4
in einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel
Anfärbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue

Spur 1 5 µl eines Phagenlysats (4×10^{12} Phagen/ml)
Spur 2 20 µl eines Phagenlysats (4×10^{12} Phagen/ml)

Tabelle 2 Molekulargewichte der S30-synthetisierten, ϕ 11-spezifischen Polypeptide und der in vivo synthetisierten Strukturproteine der Phagen 11 und 16-3 von R. meliloti 41

<u>in vitro</u> -synthetisierte, ϕ 11-spezifische Polypeptide (Abb. 11)	<u>in vivo</u> -synthetisierte Strukturproteine des Phagen 11 (Abb. 12)	<u>in vivo</u> -synthetisierte Strukturproteine des Phagen 16-3 (Erdei et al., 1982)
83.000	87.000	86.000
	71.000	72.000
	46.000	47.000
29.500	28.000	31.500
		18.500

1.3.3 Expression der DNA des Phagen R14 aus R. leguminosarum 300 im S30-System aus R. leguminosarum 300

Der Phage R14 vermehrt sich lytisch in R. leguminosarum 300. Aus Einschriftwuchskurven wurde seine Wurfgröße mit ca. 35 Phagen pro infiziertem Bakterium nach einer Latenzzeit von 140 min bestimmt (Abb. 13). Abbildung 14 zeigt die elektronenmikroskopische Darstellung des Phagen nach Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure. Man sieht einen typischen, intakten Phagen mit Kopf und langem, gebogenen Schwanz. Da der Kopf noch die Phagen-DNA enthält, erscheint er hell. Neben dem Phagen befindet sich ein leerer Phagenkopf, der durch eingedrungenes Kontrastierungsmaterial nur in den Umrissen erkennbar ist. Mit dieser Präparationsmethode ist die DNA des Phagen nicht darstellbar. Aufgrund seiner Morphologie läßt sich der Phage R14 in die Klasse 2 des Bradley-Schemas einordnen (Bradley, 1967).

Phagentiter

(logarithmische Auftragung)

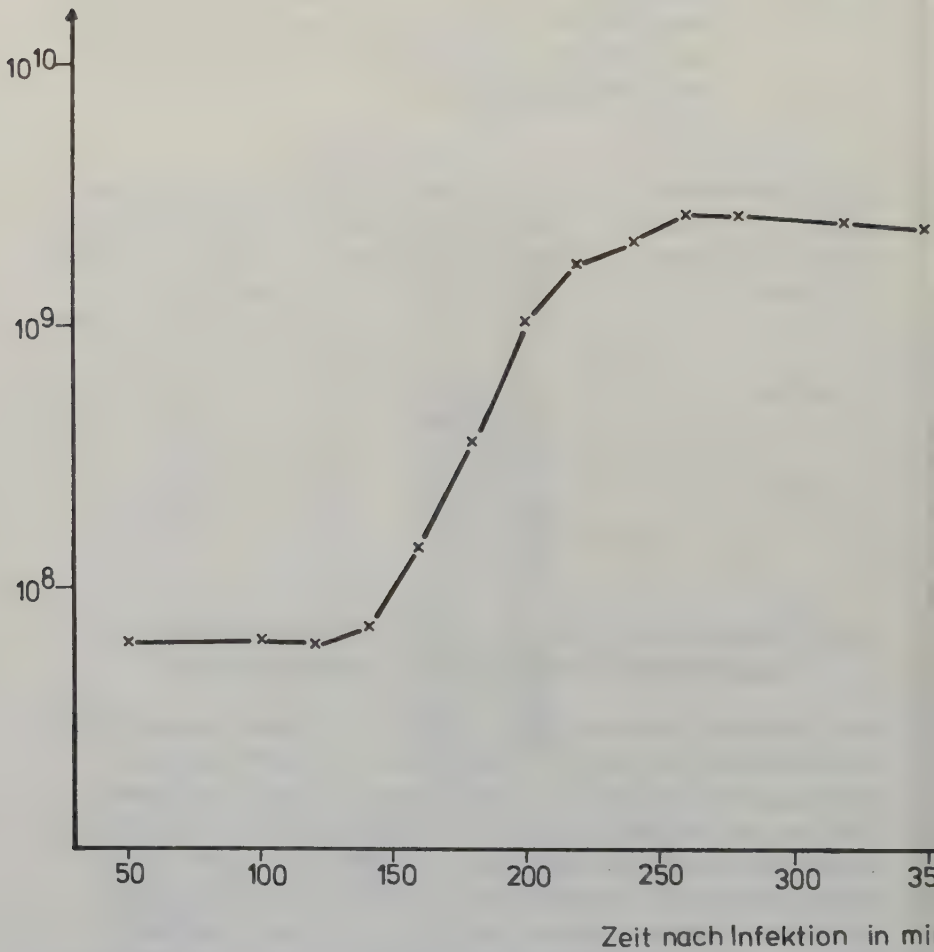


Abbildung. 13

Vermehrung des Phagen RL4 in R. leguminosarum 300 (Einschritt-Wuchskurve)

Die Wurfgröße beträgt 35 Phagen pro infiziertem Bakterium nach einer Latenzzeit von 140 min.

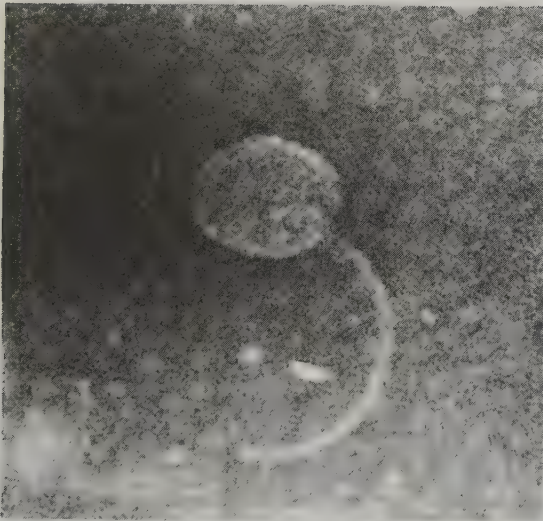


Abbildung 14

Elektronenmikroskopische Darstellung des Phagen R14 von R. leguminosarum 300 nach Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure (270.000-fache Vergrößerung)

Die Aufnahme wurde von Herrn Peter Franke gemacht.

Um die Molekulargewichte der R14-Strukturproteine zu bestimmen, wurden die Phagen eines Lysates zunächst über einen CsCl-Gradienten gereinigt. Nach Dialyse der Phagenpräparation zur Entfernung des CsCl wurden die Proteine mit SDS denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Es ergaben sich drei Hauptbanden mit den Molekulargewichten 61.000, 46.000 und 38.000 D. Zu verschiedenen Zeiten nach Infektion der Bakteriensuspension mit R14-Phagen wurden die Proteine von R14-Infektionsgemischen elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei wurden Banden mit analogen Molekulargewichten gefunden (Abb. 15). Bereits 30 min nach Infektion wurden zwei zusätzliche Banden mit den Molekulargewichten 39.000 und 49.000 D sichtbar, 90 min nach Infektion erschien ein drittes Protein mit dem Molekulargewicht 62.000 und nach 150 min ein viertes mit dem Molekulargewicht 81.000 D. In geringerer Menge synthetisierte Proteine können mit dieser Methode leicht übersehen werden, da sie von den bakteriellen Proteinen überlagert werden.

Die DNA des Phagen R14 wurde durch Phenolbehandlung aus hochtitrigen Phagenlysaten isoliert. Die R14-DNA erwies sich als resistent gegenüber den folgenden Restriktionsenzymen: EcoRI, BamHI oder Sal I. Bei Verwendung anderer Nukeinsäuren waren die Enzyme dagegen aktiv. Die DNA des Phagen 11, die genauso präpariert worden war wie die R14-DNA, wurde von BamHI geschnitten. Möglicherweise liegt eine Modifikation der R14-DNA vor, die den Abbau durch die genannten Restriktions-Endonukleasen verhindert.

R14-DNA wurde als Matrice in das in vitro-System aus R. leguminosarum 300 eingesetzt. Beim fluorographischen Nachweis der ³⁵S-markierten Polypeptide erhielt man regelmäßig zwei Banden mit den Molekulargewichten 59.000 und 51.000 D (Abb. 16).

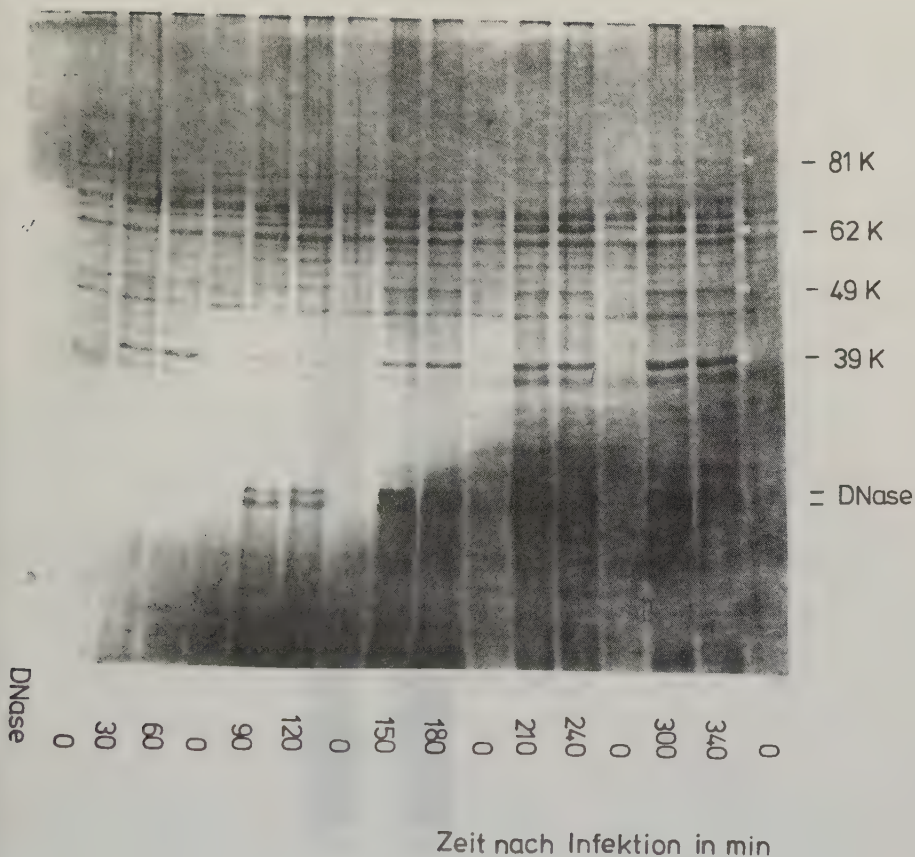


Abbildung 15

Darstellung der Proteine einer mit dem Phagen R14 infizierten *R. leguminosarum* 300-Kultur in Abhängigkeit von der Infektionszeit. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel. Die Molekulargewichte der R14-spezifischen Proteine sind angegeben. Die Elektrophoreseproben wurden ab 90 min nach Infektion zur besseren Auftrennung der Proteine mit DNase behandelt.

Anfärbung der Proteine mit Coomassie Brillant Blue.

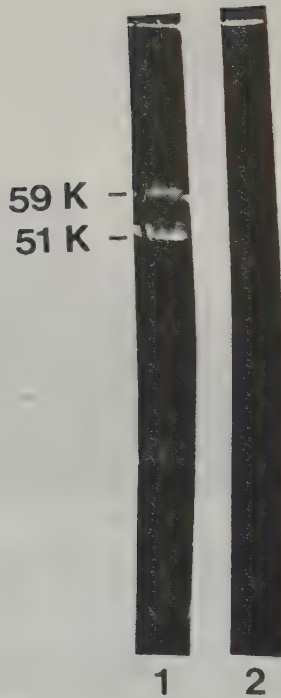


Abbildung 16

R14-DNA-abhängige in vitro-Proteinsynthese im S30-System
aus R. leguminosarum 300

Fluorogramm eines 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gels

Spur 1 S30-Extrakt + R14-DNA

Spur 2 S30-Extrakt + Tris-Acetat-Puffer

Die Molekulargewichte der Banden schwankten von Gel zu Gel stark; für die obere Bande wurden Molekulargewichte von 58.000 bis 63.000 D, für die untere von 45.000 bis 53.000 D berechnet. Die niedermolekularen Banden traten nicht in jedem Gel auf, sie ließen sich aufgrund ihrer Molekulargewichte nicht den Strukturproteinen des Phagen zuordnen. Tabelle 3 gibt eine Übersicht der Molekulargewichte der in vivo- und in vitro-synthetisierten Proteine des Phagen R14.

Tabelle 3 Molekulargewichte der S30-synthetisierten, R14-spezifischen Polypeptide und von in vivo-synthetisierten Polypeptiden des Bakteriophagen R14

<u>in vitro</u> -synthetisierte, R14-spezifische Polypeptide (Abb. 16)	R14-Strukturproteine aus gereinigten Phagenlysaten	Polypeptide aus R14-Infektionsgemischen (Abb. 15)
		81.000
59.000 (58.000-63.000)	61.000	62.000
51.000 (45.000-53.000)	46.000	49.000
	38.000	39.000

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, entsprechen die Molekulargewichte (59.000 und 51.000 D) der beiden in vitro-synthetisierten, R14-spezifischen Polypeptide den entsprechenden Werten von zwei in vivo-produzierten Strukturproteinen dieses Phagen.

1.3.4 Verschiedene Plasmid-DNA's als Matrizen für das S30-System aus R. leguminosarum 300

Die folgenden Plasmide wurden als Matrizen in das S30-System aus R. leguminosarum 300 eingesetzt:

pACYC 184

pBR 322

Col E1 lac (Col E1 + lac-Operon aus E. coli)

pRmR2 (pACYC 184 + 4 kb-Fragment aus der R. meliloti-2011-nif-Region)

pSA 31 (pBR 322 + 1,8 kb-Fragment aus der K. pneumoniae-nif-Region)

pGV 0340 (pBR 322 + Hind III-Fragmente des Ti-Plasmids aus A. tumefaciens C58)

pHU 1 (pLAFR 1 + EcoRI-Fragment mit hup-spezifischer DNA aus R. japonicum 122 DES)

Während die im selben in vitro-Versuch als Kontrollen eingesetzten Matrizen (R14- und Col E1-DNA) exprimiert wurden, wurden bei Zugabe der aufgeführten Plasmid-DNA's keine Polypeptide synthetisiert. Die fehlende Expression beruhte daher nicht auf mangelnder Aktivität des S30-Systems.

2. Das S100-System aus *R. leguminosarum* 300

2.1 Charakterisierung der Komponenten des S100-Systems

2.1.1 Fraktionierung des S30-Extrakts

Nach mechanischem Aufschluß der Zellen mit der 'French Press' wurde der resultierende Zellextrakt in 10.000xg-Abständen von 30.000 bis 100.000xg zentrifugiert. Die entstandenen Überstände (S30 - S100) wurden auf ihre Proteinsyntheseaktivität geprüft. Hierzu wurde mit Col El-DNA als Matrize die Synthese von biologisch aktivem Colizin nachgewiesen. In vitro-Ansätze mit S30- bis S60-Extrakten erzeugten klare Hemmhöfe auf Colizin-sensitiven Indikatorrasen; die Colizin-Konzentration in den Proben wurde nicht bestimmt. Bei g-Zahlen > 60.000 wurden offensichtlich für die Proteinsynthese notwendige Komponenten sedimentiert. Es handelte sich dabei größtenteils um Ribosomen, die den Hauptteil des bei der Zentrifugation entstandenen Pellets darstellten.

Aus dem ribosomenfreien Überstand der 100.000xg-Zentrifugation (Bezeichnung: Enzym- oder S100-Fraktion) wurden durch eine Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose (siehe 2.2.3) Nukleinsäuren und basische Proteine entfernt. Die so gereinigte Enzymfraktion wurde S100-DE genannt. Das Sediment der Ultrazentrifugation, hauptsächlich Ribosomen, wurde zur Isolierung einer Initiationsfaktorenfraktion (IF) verwandt, die bei manchen Präparationen durch Chromatographie an DEAE-Cellulose weiter gereinigt wurde (IF-DE). Ribosomen und RNA-Polymerase (RNAP), die im Verlauf der S100-Isolierung aus dem Zellextrakt entfernt wurden, wurden in getrennten Präparationen hergestellt.

Die Proteinmuster der aus dem S30-Extrakt entstandenen Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese miteinander verglichen (Abb. 17).

S30 - S90:

Die Proteinkonzentration der zentrifugierten Zellextrakte nahm mit zunehmender g-Zahl ab. Obwohl jeweils gleiche Volumina (2 μ l) pro Gelspur aufgetragen wurden, waren die Banden des S90- im Vergleich zum S30-Extrakt schwächer (Abb. 17A). Durch die Zentrifugationen wurden hauptsächlich ribosomale Proteine aus dem Zellextrakt entfernt, wie aus Abb. 17B (15%iges SDS-Polyacrylamidgel durch Vergleich der S30-, S90- und Ribosomenfraktion ersichtlich ist. Außerdem nahm die Konzentration an RNAP in der Enzymfraktion ab, die Banden der β - und β' -Untereinheiten sind in der S90-Fraktion wesentlich schwächer als in der S30-Fraktion. Aus der Literatur ist bekannt, daß die RNAP von E. coli durch längere Zentrifugation bei höheren g-Zahlen sedimentiert werden kann (Schweiger und Herrlich, 1974).

S100 - S100-DE:

Die DEAE-Cellulose-Chromatographie nach Münch und Berg (1966) bewirkte eine Anreicherung bestimmter Banden und das Verschwinden anderer (Abb. 17A), u.a. die Entfernung der RNA-Polymerase (β - und β' -Banden sind nicht mehr vorhanden). DEAE-Cellulose trennt außer Nukleinsäuren auch basische Proteine aus dem Zellextrakt ab (Schweiger und Herrlich, 1974).

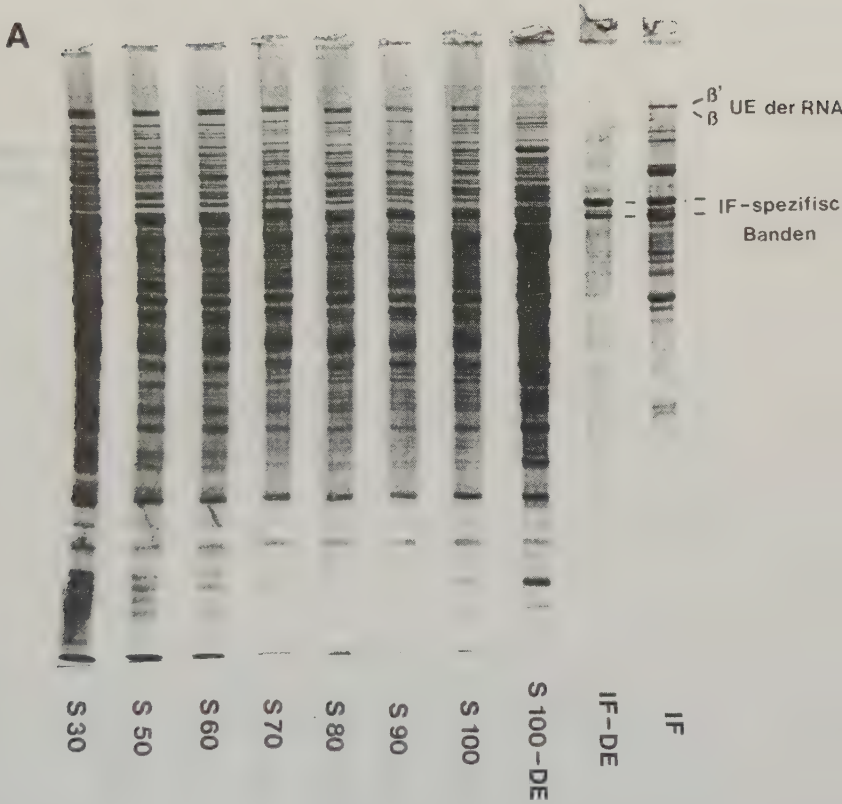


Abbildung 17A

Elektrophoretische Auftrennung der Proteine der in vitro-Komponenten aus R. leguminosarum 300 in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel

Anfärbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue

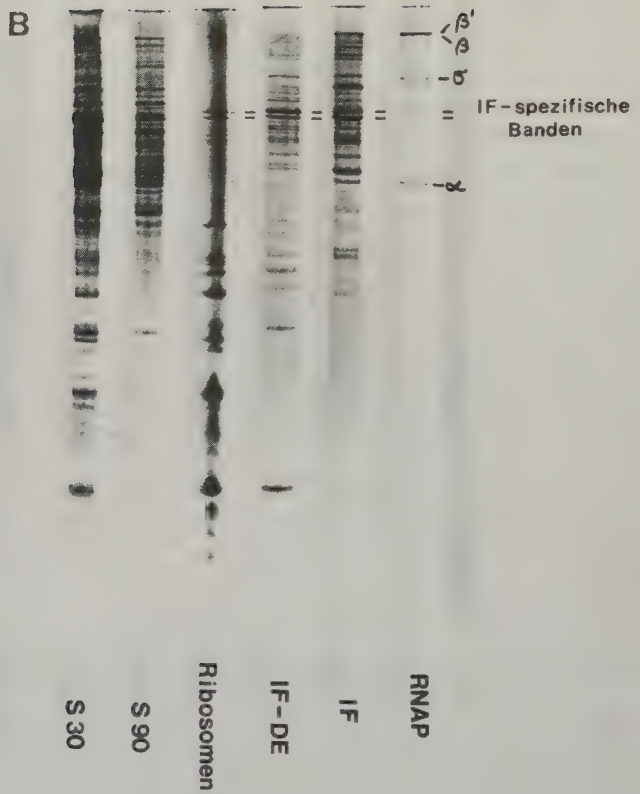


Abbildung 17B

Elektrophoretische Auftrennung der Proteine der in vitro-Komponenten aus R. leguminosarum 300 in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel
Anfärbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue

Initiationsfaktoren:

Eine grobe IF-Präparation enthielt noch eine Vielzahl von Proteinen, u.a. auch RNAP (Abb. 17A). Durch die DEAE-Cellulose-Chromatographie wurden sie bis auf zwei prominente Banden entfernt (IF-DE). Einige Proteine mit niedrigem Molekulargewicht, die auch in der Ribosomenfraktion vorhanden waren, wurden angereichert (Abb. 17E).

Ribosomen:

Die Ribosomenpräparationen enthielten keine RNAP, aber die beiden charakteristischen IF-Banden (Abb. 17B).

RNA-Polymerase:

Die RNAP-Fraktion bestand bis auf schwache Hintergrundbanden nur aus den Banden ihrer Untereinheiten und dem Sigma-Faktor (Abb. 17P).

2.1.2 Gelelektrophoretischer Vergleich der Komponenten der S100-Systeme von *R. leguminosarum* 300 und *E. coli*

Abbildung 18 zeigt die Proteinzusammensetzung der in vitro-Komponenten aus *E. coli* und *R. leguminosarum* 300. Die Präparationsmethoden der verschiedenen Fraktionen waren, bis auf geringe Modifikationen, identisch.

Obwohl das Bandenmuster in einigen Fällen erheblich differierte, waren manche Komponenten in der Lage, sich gegenseitig in in vitro-Translations- (siehe 2.2.1.2) bzw. Transkriptions-/Translationsversuchen (siehe 2.2.2) zu komplementieren.

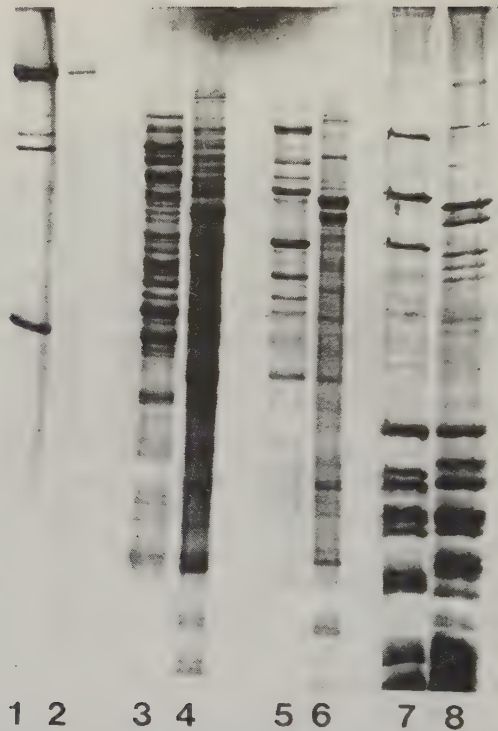


Abbildung 18

Darstellung der Proteine der in vitro-Komponenten aus R. leguminosarum 300 und E. coli in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel
Anfärbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue

- Spur 1 RNA-Polymerase aus E. coli
- Spur 2 RNA-Polymerase aus R. leguminosarum 300
- Spur 3 S100-DE aus E. coli
- Spur 4 S100-DE aus R. leguminosarum 300
- Spur 5 IF-DE aus E. coli
- Spur 6 IF-DE aus R. leguminosarum 300
- Spur 7 Ribosomen aus E. coli
- Spur 8 Ribosomen aus R. leguminosarum 300

2.1.3 Untersuchung der in vitro-Komponenten aus R. leguminosarum 300 auf ihren Protease- und Nukleasegehalt

Da die in vitro-Proteinsynthese durch Anwesenheit von Proteasen und Nukleasen empfindlich gestört wird, ist es wichtig, das Vorhandensein dieser Enzyme in den einzelnen Fraktionen zu überprüfen. Zum Test auf Proteaseaktivität wurden die in vitro-Komponenten zusammen mit dem Reaktionsmix unter Standard-in vitro-Proteinsynthesebedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Proteinmuster mit denen nicht inkubierter Proben verglichen.

Da sich in allen Fällen jeweils das gleiche Proteinmuster ergab, wurde angenommen, daß eventuell vorhandene Proteasen zumindest unter den gegebenen Bedingungen inaktiv waren. Ähnlich wurde bei den Tests auf DNase- und RNase-Aktivität vorgegangen. Es wurde Col El-DNA bzw. tRNA aus Hefe als Substrat verwendet und in Gegenwart von Reaktionsmix und der zu prüfenden in vitro-Komponente 90 min bei 29°C inkubiert.

Mit Agarosegelelektrophorese wurde das Plasmid analysiert, die tRNA wurde in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen. Da sich durch die Inkubation die Bandenmuster der Plasmid- und der tRNA-Präparationen nicht änderten, konnte weder eine DNase- noch eine RNaseaktivität festgestellt werden. Es wurde daher angenommen, daß die in vitro-Proteinsynthese nicht von solchen Enzymen gestört wurde.

2.2 in vitro-Versuche zur Bestimmung der Proteinsyntheseaktivität der einzelnen Komponenten des S100-Systems aus R. leguminosarum 300

Wenn ein S100-in vitro-System inaktiv ist, liegt dies im einfachsten Fall an der DNA-Matrize oder am Reaktionsmix.

Diese Möglichkeit läßt sich durch Einsetzen der beiden Faktoren in das S30-System überprüfen.

Schwieriger gestaltet es sich, die Aktivität der in vitro-Komponenten zu überprüfen. Da dies nur durch Vergleich mit einem funktionierenden in vitro-System möglich ist, wurden aus E. coli isolierte Komponenten als Referenz verwendet. Um die Komponenten unabhängig voneinander testen zu können, wurden zunächst Transkription und Translation getrennt untersucht, anschließend einzelne R. leguminosarum-in vitro-Komponenten im gekoppelten System aus E. coli eingesetzt.

2.2.1 Getrennte Transkription und Translation

2.2.1.1 Transkriptionsversuche

Die Isolierung der RNAP aus R. leguminosarum erfolgte nach der Methode von Lotz et al., 1981: nach dem Zellaufschluß wurde die RNAP zuerst durch Polymin P-, dann durch Ammonsulfatfällung angereichert. Mit einer Affinitätschromatographie an Sepharose 4B, an die kovalent Kalbsthymus-DNA gebunden war, wurden DNA-bindende Proteine angereichert, die Abtrennung der RNAP erfolgte durch Gelfiltration an Biogel A5m. Sowohl nach Affinitäts- als auch nach Biogel-Chromatographie erfolgte ein in vitro-Transkriptionstest zur Bestimmung der enzymatisch aktiven Fraktionen. Beim Vergleich der DNA-Sepharose-Säule- mit den Biogel-Säule-Fraktionen zeigte sich, daß die enzymatische Aktivität der Präparation mit fortschreitender Reinigung abnahm (Tabelle 4). Daher wurden für das in vitro-Proteinsynthese-System die RNAP-Fraktionen nach DNA-Sepharose-Chromatographie nur noch gegen den Aufbewahrungspuffer dialysiert, wodurch eine zusätzliche Konzentrierung erfolgte.

Tabelle 4 Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten der RNA-Polymerasen aus R. leguminosarum 300 und E. coli im in vitro-Transkriptionsversuch mit Col El-DNA als Matrize

	Einbau von ^3H -UTP in TCA-fällbares Material
<u>RNAP aus R. leguminosarum 300</u>	
aktivste Fraktion der DNA-Sepharose-Säule (5 μ l)	6.464 cpm
aktivste Fraktion der Bio-gel A5m-Säule (5 μ l)	2.352 cpm
konzentrierte DNA-Sepharose-Fraktion (5 μ l)	26.270 cpm
<u>RNAP aus E. coli</u> (5 μ l)	84.608 cpm

Verglichen mit der RNAP aus E. coli war das aus R. leguminosarum 300 isolierte Enzym sehr viel weniger aktiv. Trotzdem erwies sich die Aktivität für die in vitro-Proteinsynthese als ausreichend, wie Versuche mit dem gekoppelten Transkriptions-Translationssystem zeigten (siehe 2.2.2).

2.2.1.2 Translationsversuche in einem kombinierten in vitro-System aus *R. leguminosarum*- und *E. coli*-Komponenten

In vitro-Translationsversuche dienen der Aktivitätsbestimmung von S100, IF's und Ribosomen. Die *R. leguminosarum*-Komponenten wurden in Kombination mit Komponenten aus *E. coli* MRE 600 im Kurland-System (Jelenc und Kurland, 1979) untersucht. Der Polymix nach Kurland enthielt im Gegensatz zum Reaktionsmix des gekoppelten Systems kein Tris. Die Mg-Konzentration war stark reduziert, da zusätzlich Polyamine (Putrescin und Spermidin) zugegeben wurden. Magnesium kann, bis zu einem gewissen Ausmaß, durch Polyamine ersetzt werden (Herrlich et al., 1971). Als messenger diente die RNA des Bakteriophagen MS2 von *E. coli*. MS2-RNA ist polycistronisch und kodiert für vier Proteine (Kastelein et al., 1982): das Reifungsprotein, das Hüllprotein, die RNA-Replikase und das Lysis-Protein. Bis auf das Lysis-Gen, das zur Ablesung einer Leserasterverschiebung bedarf, werden alle Proteine in vitro vollständig synthetisiert (Watanabe et al., 1981).

Im Translationsversuch wurden 2 Enzymfraktionen, 2 Ribosomen- und eine IF-Präparation von *R. leguminosarum* 300 geprüft (Tabelle 5).

Tabelle 5 Bestimmung der Aktivität der in vitro-Komponenten aus R. leguminosarum 300 durch Vergleich mit in vitro-Komponenten aus E. coli im in vitro-Translationstest

	Ribosomen aus	S100 aus	IF-Fraktion aus	tRNA aus <u>E. coli</u>	mRNA	Einbau von ³⁵ S-Methionin in TCA-fällbares Material (in cpm)
1	<u>E. coli</u>	<u>E. coli</u>	<u>E. coli</u>	GBI-5-41	MS2	3460
2	<u>E. coli</u>	<u>E. coli</u>	<u>E. coli</u>	MRE	MS2	4650
3	<u>R. leg 300</u>	<u>E. coli</u>	<u>E. coli</u>	GBI-5-41	MS2	4775
4	<u>E. coli</u>	<u>R. leg 300</u>	<u>E. coli</u>	GBI-5-41	MS2	625
5	<u>E. coli</u>	<u>E. coli</u>	<u>R. leg 300</u>	GBI-5-41	MS2	3450

Beide eingesetzten Enzymfraktionen aus R. leguminosarum waren im E. coli-spezifischen in vitro-System inaktiv. Mit Ribosomen und Initiationsfaktoren aus R. leguminosarum 300 entsprach dagegen der radioaktive Einbau dem der entsprechenden E. coli-Werte. Die Aktivität der IF-Fraktion wurde mit tRNA's aus zwei verschiedenen E. coli-Stämmen geprüft. Transfer-RNA aus E. coli MRE benötigt formyliertes Methionin (f-met) zur Initiation der Translation (Petersen et al., 1976), während tRNA aus E. coli GB1-5-41 str auch unformyliert initiieren kann (Männlein-Janecek, 1983). Da die Initiationsfaktoren aus R. leguminosarum 300 mit beiden tRNA's funktionierten, enthielten sie keine Deformylase, im Gegensatz zur IF 1 und 3-Präparation aus E. coli. Da die Initiationsfaktoren 1 und 3 hitzestabil sind, kann die Deformylase aus E. coli durch 5-minütiges Erhitzen der Präparation auf 68°C inaktiviert werden (Manderschied, 1980).

Die MS2-Translationsversuche wurden zusammen mit Frau Männlein-Janecek vom Institut für Physiologische Chemie durchgeführt.

2.2.2 Gekoppelte Transkription und Translation in einem kombinierten in vitro-System aus R. leguminosarum- und E. coli-Komponenten

Für gekoppelte Transkriptions-Translationsversuche wurde der Reaktionsmix (RM) nach Strycharz und Nomura (1978) verwendet. Es wurde ausschließlich radioaktiv gearbeitet, obwohl (siehe 2.3.1) bei Verwendung von Col EI-DNA als Matrizie in vitro-synthetisiertes Colizin auch durch Auftropfen auf einen sensitiven Indikatorrasen nachgewiesen werden konnte.

Die in vitro-Komponenten aus E. coli wurden gemäß den Vorschriften (Wagner, 1982) verwendet. Das optimierte System hatte folgende Zusammensetzung (bezogen auf das Gesamtvolumen des in vitro-Ansatzes von 40 μ l):

1	μ l	RNAP	=	4,6	μ g	Protein
7,2	μ l	S100	=	39	μ g	Protein
6,0	μ l	IF	=	20	μ g	Protein
1,75	μ l	Ribosomen	=	1,5	$\text{\AA}_{260}$ -Einheiten	
10	μ l	DNA	=	1,5-3	μ g	DNA

Die Mg-Konzentration wurde mit Hilfe des Angleichpuffers auf 12 mM eingestellt.

Zur weiteren Aktivitätsbestimmung der aus R. leguminosarum isolierten Fraktionen wurde jeweils eine Komponente des E. coli-Systems durch die entsprechende von R. leguminosarum ersetzt. Die Inkubation erfolgte mit Rücksicht auf die R. leguminosarum-Komponenten bei der für E. coli ungünstigeren Temperatur von 30°C. Als Matrize diente Col El-DNA. Der fluorographische Nachweis der in vitro-synthetisierten Polypeptide (Abb. 19A) zeigte, daß ein Ersetzen der RNAP und Initiationsfaktoren aus E. coli durch die entsprechenden Komponenten aus R. leguminosarum 300 das gleiche Bandenmuster ergab wie beim kompletten E. coli-System. RNAP aus R. leguminosarum synthetisierte demnach eine mRNA, die von E. coli-Ribosomen translatiert wurde. Ebenso ließen sich die Initiationsfaktoren aus E. coli ohne Schwierigkeiten durch solche aus R. leguminosarum ersetzen. Dies entsprach dem Ergebnis der Translationsversuche (siehe 2.2.1.2). Dagegen wurden bei Verwendung von R. leguminosarum-Ribosomen im E. coli-System keine Polypeptide synthetisiert, obwohl die Ribosomen im MS2-Translationstest zusammen mit der S100-Fraktion aus E. coli aktiv waren. Möglicherweise war die im Rhizobium-System optimale Ribosomenkonzentration (1,9 $\text{\AA}_{260}$ -Einheiten) für das E. coli-System zu hoch.

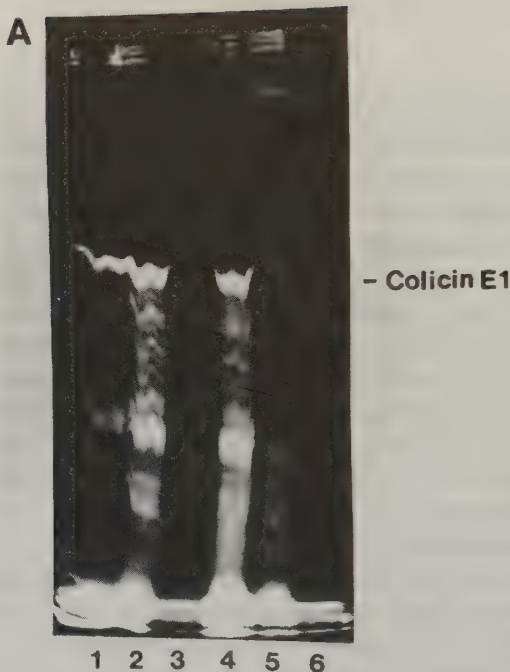


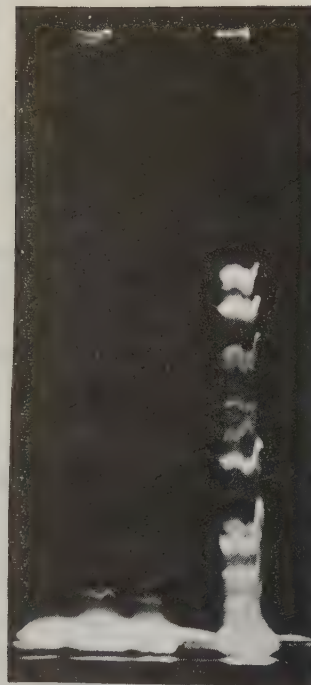
Abbildung 19 A

Col E1-DNA-abhängige in vitro-Proteinsynthese im S100-System aus E. coli in Kombination mit einzelnen in vitro-Komponenten aus R. leguminosarum 300

Fluorogramm eines 12,5%igen Polyacrylamid-Gels

- Spur 1 iv-System aus E. coli + Col E1-DNA
- Spur 2 iv-System aus E. coli + RNAP aus R. leguminosarum 300
+ Col E1-DNA
- Spur 3 iv-System aus E. coli + Ribosomen aus R. leguminosarum 300
+ Col E1-DNA
- Spur 4 iv-System aus E. coli + Initiationsfaktoren aus
R. leguminosarum 300 + Col E1-DNA
- Spur 5 iv-System aus E. coli + S100 aus R. leguminosarum 300
+ Col E1-DNA
- Spur 6 iv-System aus E. coli + Tris-Acetat-Puffer

B



- R14-DNA-spezifische
- Proteine

1 2 3 4 5 6

Abbildung 19 B

R14-DNA-abhängige in vitro-Proteinsynthese im S100-System
aus R. leguminosarum in Kombination mit einzelnen in vitro-
Komponenten aus E. coli

Fluorogramm eines 12,5%igen Polyacrylamid-Gels

- Spur 1 iv-System aus R. leguminosarum 300 + R14-DNA
- Spur 2 iv-System aus R. leguminosarum 300 + RNAP aus E. coli
+ R14-DNA
- Spur 3 iv-System aus R. leguminosarum 300 + Ribosomen aus
E. coli + R14-DNA
- Spur 4 iv-System aus R. leguminosarum 300 + Initiations-
faktoren aus E. coli + R14-DNA
- Spur 5 iv-System aus R. leguminosarum 300 + S100 aus
E. coli + R14-DNA
- Spur 6 iv-System aus R. leguminosarum 300 + Tris-Acetat-
Puffer

Es ist bekannt, daß zu hohe Ribosomenkonzentrationen die Translation hemmen (Schweiger und Herrlich, 1974).

Aus Abbildung 19A geht weiterhin hervor, daß das E. coli-System bei Verwendung einer R. leguminosarum-S100-Präparation inaktiv war.

Diese Ergebnisse ließen sich folgendermaßen überprüfen: im R. leguminosarum-in vitro-System wurde jeweils eine Komponente durch die entsprechende Fraktion von E. coli ersetzt (Abb. 19E). Als Matrize diente die DNA des Phagen F14 von R. leguminosarum 300. Dabei ergab sich, daß das R. leguminosarum-System bei Zugabe von E. coli-S100 funktionierte. Das Austauschen aller anderen in vitro-Komponenten hatte keinen stimulierenden Effekt auf die Proteinsynthese. Demnach waren zum Zeitpunkt des Versuchs alle Komponenten des R. leguminosarum-in vitro-Systems, mit Ausnahme der S100-Fraktion aktiv.

2.2.3 Isolierung aktiver S100-Enzymfraktionen

Die Präparation des S100-Enzymüberstandes wurde nach zwei Anleitungen durchgeführt. Nach mechanischem Zellaufschluß wurden durch niedrigtourige Zentrifugationen Zellwand- und Membranreste entfernt. Es schloß sich eine hochtourige Zentrifugation an, bei der hauptsächlich Ribosomen (bei sehr hohen g-Zahlen auch RNAP) sedimentiert wurden. Über dem Ribosomensediment lag eine vor allem aus DNA bestehende Schicht. Durch Zentrifugation konnte die DNA nicht quantitativ aus dem Zellextrakt entfernt werden. Daher wurde der S100-Überstand einer Chromatographie an DEAE-Cellulose (Abb. 20) unterworfen, wodurch Nukleinsäuren (u.a. auch tRNA) abgetrennt wurden (Schweiger und Herrlich, 1974).

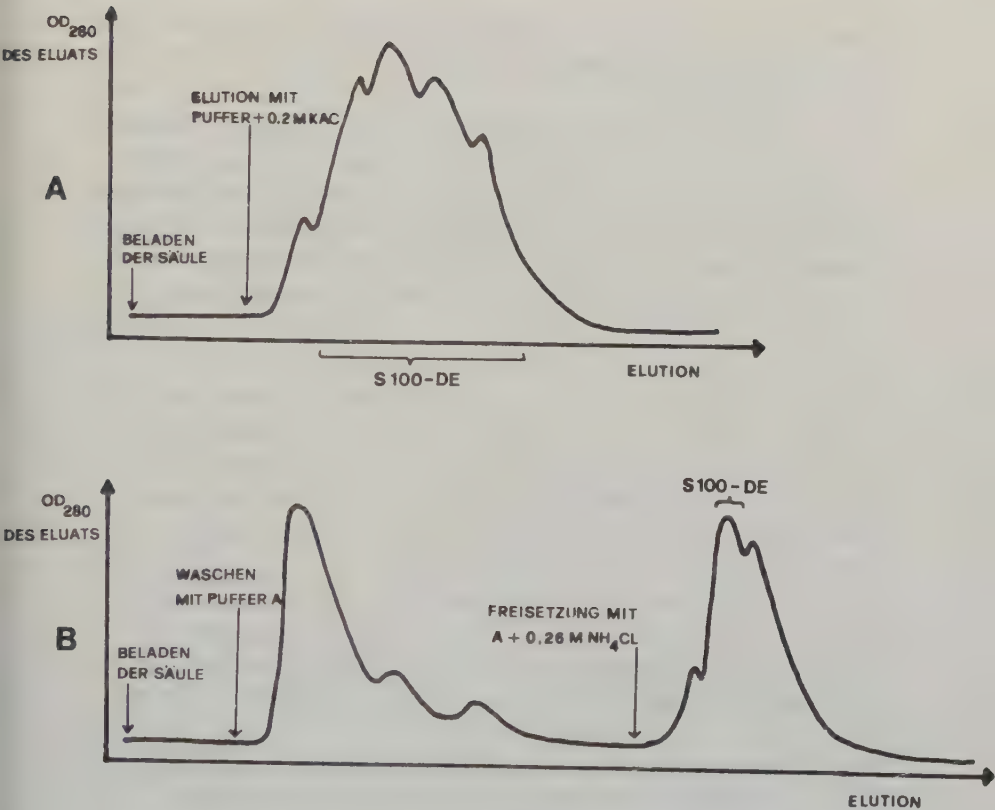


Abbildung 20

Graphische Darstellung der DEAE-Cellulose-Chromatographie der S100-Fraktion

A S100-DE-Präparation nach Nirenberg (1963) und Münch und Berg (1966)

B S100-DE-Präparation nach Traub et al., 1971

In der Chromatographie an DEAE-Cellulose unterschieden sich die beiden Präparationsmethoden:

1. S100-DE nach Nirenberg (1963) und Münch und Berg (1966)
Die DEAE-Cellulose-Säule wurde mit dem Zellextrakt (in Nirenberg-Puffer) beladen. Eluiert wurde mit dem Elutionspuffer, der 0,2 M K-Acetat enthielt. Der Peak wurde gesammelt, die Proteine mit Ammonsulfat gefällt (100% Sättigung). Das Präzipitat wurde in TMNSH gelöst und dialysiert.
2. S100- Herstellung nach Traub et al., 1971
Der Zellextrakt (in Puffer A) wurde auf die DEAE-Cellulosesäule geladen, anschließend wurde mit Puffer A gewaschen, bis die OD_{280} des Eluates auf Null gesunken war. Die Freisetzung der S100-Proteinfraktion erfolgte mit Puffer A + 0,26 M NH_4Cl . Der Peak wurde gesammelt und gegen Puffer A dialysiert.

Bei der Präparation nach Münch und Berg (1966) wurden von der Säule als S100-DE-Fraktion alle Proteine eluiert, die nicht an DEAE-Cellulose binden, und zusätzlich solche, die von K-Acetat-Konzentrationen bis 0,2 M freigesetzt wurden.

Bei der Präparation nach Traub et al. (1971) wurden die Proteine des Zellextrakts weiter fraktioniert. Durch das Waschen der beladenen Säule mit Puffer A wurden alle nicht an das Säulenmaterial bindenden Proteine abgetrennt. Als S100-DE-Fraktion wurden nur die Proteine, die von NH_4Cl -Konzentrationen bis 0,26 M freigesetzt wurden, bezeichnet. Bei dieser Präparation wurde daher im Gegensatz zur 1. Methode ein wesentlich kleinerer Teil der Proteine des Zellextrakts verwendet.

Beide genannten Präparationswege führten zu aktiven S100-Fraktionen. Die S100-Enzymfraktionen (unabhängig von der Isolierungsmethode) waren hingegen inaktiv, wenn sie aus Bakterienzellen isoliert wurden, die länger als 3 Monate bei $-20^{\circ}C$ gelagert worden waren. Die Zellen sollten relativ bald nach der Ernte verwendet werden.

Auch die Haltbarkeit der fertigen S100-Präparationen war begrenzt. Sie waren bei Lagerung bei -20°C maximal 3 Monate aktiv, während die Aktivität der Initiationsfaktoren, Ribosomen und RNA-Polymerase länger erhalten blieb.

Die im folgenden beschriebenen Optimierungsversuche des in vitro-Systems aus P. leguminosarum 300 wurden mit S100-Fractionen durchgeführt, die aus frisch geernteten Zellen nach der Methode von Traub et al. (1971) isoliert worden waren.

2.2.4 Optimierung des S100-Systems aus *R. leguminosarum* 300

Die optimalen Konzentrationen der einzelnen in vitro-Komponenten wurden sowohl durch Bestimmung des höchsten Einbaus von ^{35}S -Methionin in TCA-fällbares Material als auch durch fluorographische Analyse der synthetisierten Polypeptide ermittelt. Es wurde jeweils nur die Konzentration einer einzelnen in vitro-Komponente variiert.

Das komplette in vitro-System aus *R. leguminosarum* 300 setzte sich für bestimmte Präparationen folgendermaßen zusammen:

RNAP:	3,5 μg Protein	(4,6 μg Protein)
S100:	35 μg Protein	(39 μg Protein)
Initiationsfaktoren:	10 μg Protein	(20 μg Protein)
Ribosomen:	1,2 A_{260} -Einheiten	(1,5 A_{260} -Einheiten)
DNA:	1-3 μg	(1,5-3 μg DNA)

In Klammern sind die für das S100-System aus *E. coli* optimalen Konzentrationen (siehe 2.2.2) angegeben. Für neue Präparationen müssen die Optima jeweils neu bestimmt werden.

Die Optimierung der Inkubationsbedingungen erfolgte wie bei den S30-Versuchen beschrieben (siehe 1.2).

Seine maximale Aktivität erreichte das S100-System bei einer Inkubationstemperatur von 29°C (Abb. 21).

Die Inkubationszeit wurde wie beim S30-System auf 90 min festgelegt, obwohl bis zur maximal getesteten Inkubationszeit von 120 min der Einbau von ^{35}S -Methionin in TCA-fällbares Material weiter zunahm (Abb. 22). Ein linearer Anstieg der Proteinsyntheseaktivität war jedoch nur 40 min lang zu beobachten.

Zur Optimierung der Mg-Konzentration im S100-System aus *R. leguminosarum* 300 wurden die bei Konzentrationen von 8-20 mM Mg^{2+} synthetisierten Polypeptide fluorographisch dargestellt. Als Matrize wurde Col El-DNA verwendet. Die optimale Mg-Konzentration lag bei 16 mM (Abb. 23), da in dieser Probe die Colizin El-Bande am stärksten exprimiert wurde.

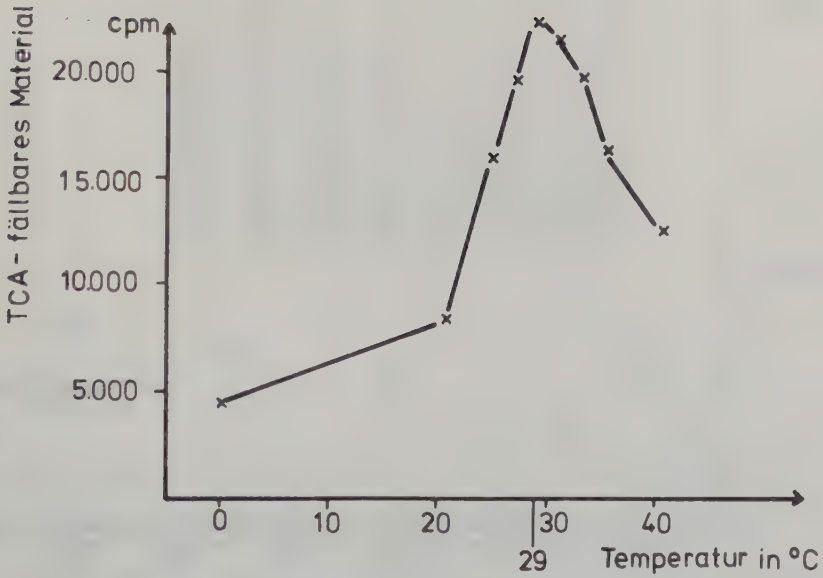


Abbildung 21

Abhängigkeit der in vitro-Proteinsynthese im S100-System aus E. leguminosarum 300 von der Inkubationstemperatur

(Col E1-DNA als Matrize)

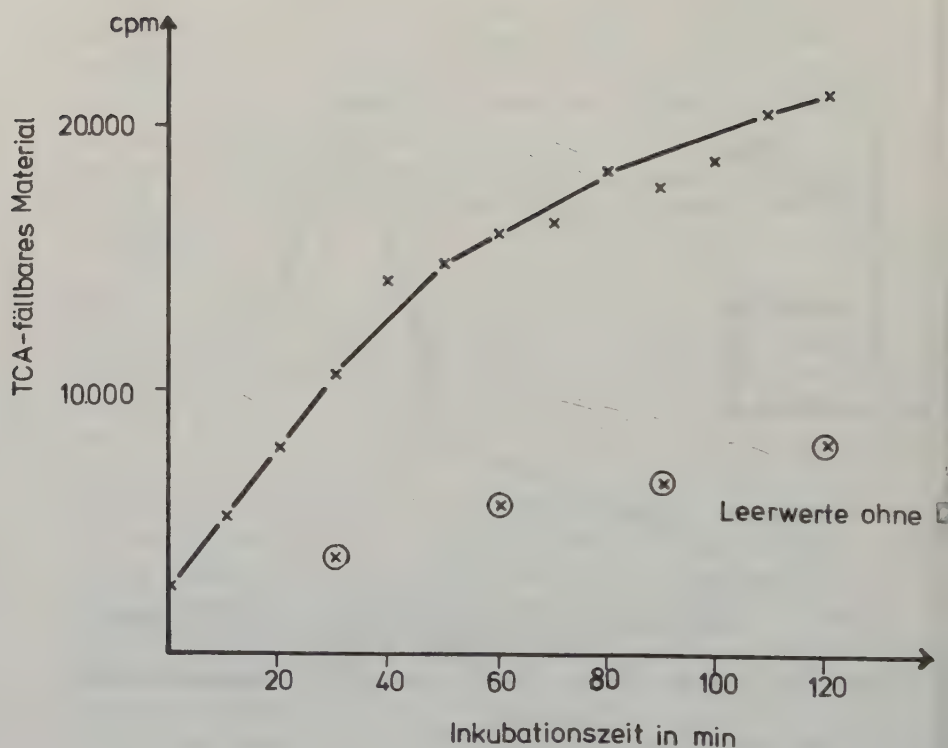


Abbildung 22

Abhängigkeit der in vitro-Proteinsynthese im S100-System aus R. leguminosarum 300 von der Inkubationszeit

(Col E1-DNA als Matrize)

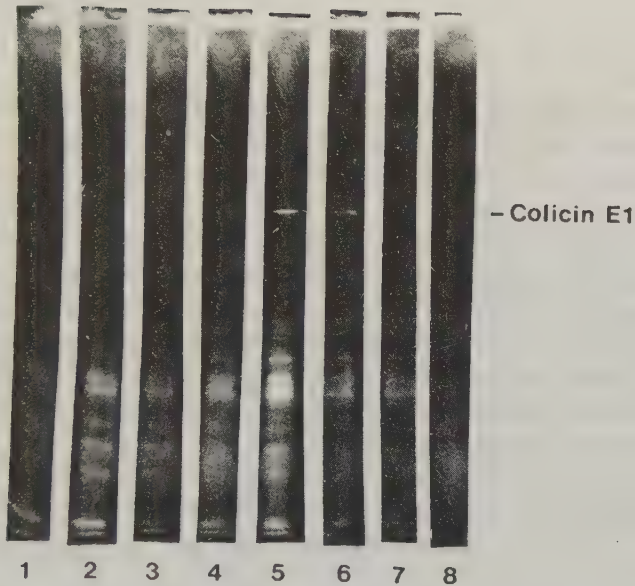


Abbildung 23

Abhängigkeit der in vitro-Proteinsynthese im S100-System aus
R. leguminosarum 300 von der Mg^{2+} -Konzentration
Fluorogramm eines 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gels
(Col E1-DNA als Matrize)

Spur 1	S100-System + Col E1-DNA	(8 mM Mg^{2+})
Spur 2	S100-System + Col E1-DNA	(10 mM Mg^{2+})
Spur 3	S100-System + Col E1-DNA	(12 mM Mg^{2+})
Spur 4	S100-System + Col E1-DNA	(14 mM Mg^{2+})
Spur 5	S100-System + Col E1-DNA	(16 mM Mg^{2+})
Spur 6	S100-System + Col E1-DNA	(18 mM Mg^{2+})
Spur 7	S100-System + Col E1-DNA	(20 mM Mg^{2+})
Spur 8	S100-System + Tris-Acetat-	(16 mM Mg^{2+})
	Puffer	

Das erstellte S100-System erwies sich als DNA-abhängig. Durch steigende Konzentrationen an zugegebener DNA wurde der Einbau von ^{35}S -Methionin in TCA-fällbares Material stimuliert (Abb. 24).

Zur weiteren Charakterisierung des in vitro-Systems aus R. leguminosarum 300 wurden die Restaktivitäten im inkompletten System bestimmt (Tabelle 6). Es wurde mindestens eine Komponente im System durch den entsprechenden Puffer ersetzt und der Einbau von ^{35}S -Methionin in TCA-fällbares Material bestimmt. Die Auswertung erfolgte in % des kompletten in vitro-Systems.

Tabelle 6 Bestimmung der Restaktivitäten im inkompletten S100-System aus R. leguminosarum 300

komplettes System	+ DNA	14.458 cpm	100%
komplettes System	- DNA	6.679 cpm	46%
<u>in vitro</u> -System - S100	+ DNA	3.933 cpm	27%
<u>in vitro</u> -System - IF	+ DNA	7.321 cpm	50%
<u>in vitro</u> -System-S100-IF	+ DNA	2.418 cpm	17%
<u>in vitro</u> -System - Ribos	+ DNA	7.366 cpm	51%
<u>in vitro</u> -System - RNAP	+ DNA	8.026 cpm	56%

Ohne Zugabe von DNA wurden noch immer 46% des Einbaus von ^{35}S -Methionin in TCA-fällbares Material des Kontrollwerts (komplettes in vitro-System + DNA) synthetisiert. Dieser hohe Leerwert kam nicht durch die Anwesenheit von DNA oder mRNA im System zustande, da auf Fluorogrammen in den in vitro-Ansätzen ohne DNA keine Banden zu erkennen waren (siehe 2.3).

Vergleiche mit dem S30-System aus R. leguminosarum 300 zeigten, daß bei Zugabe von Hemmern der Transkription und Translation (Rifampicin und Streptomycin in Konzentrationen von 4 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Synthesemix) ebenfalls noch 33% des Einbaus des Komplettwerts synthetisiert wurden (Tabelle 1).

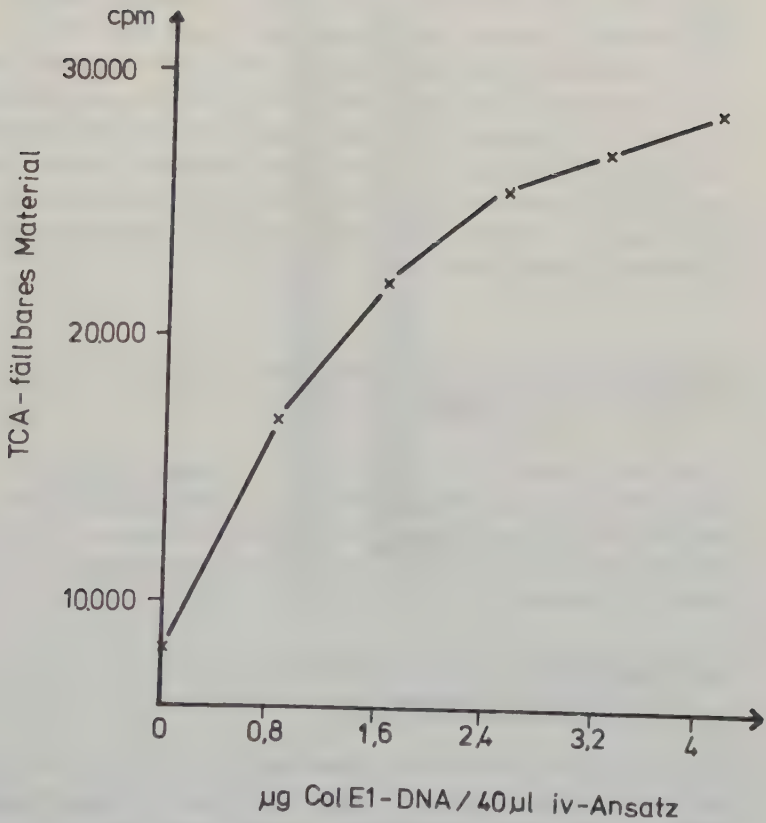


Abbildung 24

Abhängigkeit der in vitro-Proteinsynthese im S100-System aus R. leguminosarum 300 von der DNA-Konzentration

(Col E1-DNA als Matriz)

Die anderen etwas hohen Werte bei der Bestimmung der Restaktivitäten im inkompletten S100-System aus R. leguminosarum 300 kamen wahrscheinlich dadurch zustande, daß eine quantitative Trennung der Komponenten nicht möglich war (z.B. enthielten Ribosomenpräparationen immer größere Mengen an Initiationsfaktoren, siehe Abb. 17). Es ist bekannt, daß auch die Trennung von Initiationsfaktoren und anderen notwendigen Enzymen in IF- und S100-Fractionen unvollständig ist. Beide Fractionen müssen aus dem in vitro-Ansatz weggelassen werden, um den ^{35}S -Methionin-Einbau drastisch zu reduzieren (Kaltschmidt et al., 1974).

2.3 Expression von Plasmid- und Phagen-DNA im S100-in vitro-System aus R. leguminosarum 300

Im neu erstellten S100-System aus R. leguminosarum 300 wurden vor allem die Plasmid-DNA Col El aus E. coli und die DNA des R. leguminosarum-Phagen R14 verwendet. Beide DNA's wurden bereits in das S30-System eingesetzt (siehe 1.3.1 und 1.3.3).

2.3.1 Expression der Col El-Plasmid-DNA im S100-System aus R. leguminosarum 300

Mit Col El-DNA als Matrize wurde bei fluorographischer Analyse der in vitro-synthetisierten Polypeptide eine Hauptbande mit dem Molekulargewicht 54.000 D nachgewiesen (Abb. 25). Es handelte sich sehr wahrscheinlich um Colizin El. Durch Sequenzierung des Colizin El-Gens wurde ein theoretisches Molekulargewicht des Colizinproteins von 57.279 D berechnet (Yamada et al., 1982). Außerdem wurde

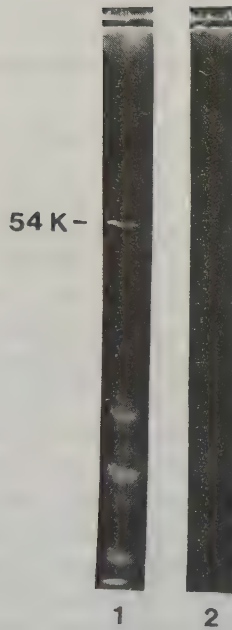


Abbildung 25

Col E1-DNA-abhängige in vitro-Proteinsynthese im S100-System
aus R. leguminosarum 300
Fluorogramm eines 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gels

Spur 1 S100-System + Col E1-DNA

Spur 2 S100-System + Tris-Acetat-Puffer

beim Auftropfen des in vitro-Ansatzes auf Colizin-sensitiven Indikatorrasen bakterizide Aktivität nachgewiesen. Im Vergleich zu S30-Versuchen war die in vitro-Proteinsynthese jedoch wesentlich schwächer, da der S100-in vitro-Ansatz nur unverdünnt das Wachstum der Indikatorbakterien hemmte.

2.3.2 Expression der DNA des Phagen R14 im S100-System aus R. leguminosarum 300

Bei Verwendung von R14-DNA als Matrize wurden in vitro hauptsächlich zwei Proteine mit den Molekulargewichten 63.000 und 50.000 D synthetisiert (Abb. 26). Diese Werte stimmen gut mit den Molekulargewichten der R14-spezifischen Banden, die im S30-System von R. leguminosarum 300 synthetisiert worden waren, 59.000 und 51.000 D, überein (siehe Tabelle 3). Wie im S30-System waren auch hier die Molekulargewichte der Banden von Gel zu Gel etwas unterschiedlich, sie schwankten von 63.000 bis 66.000 D bei der oberen und von 48.000 bis 53.000 D bei der unteren Bande. Im Vergleich dazu betrugen die Molekulargewichte der R14-Strukturproteine (bei Analyse von gereinigten Phagenlysaten) 61.000, 46.000 und 38.000 D. Im R14-infizierten R. leguminosarum-Zellen wurden vier phagenspezifische Proteine mit den Molekulargewichten 81.000, 62.000, 49.000 und 39.000 D nachgewiesen (Zusammenstellung der Werte siehe Tabelle 3). Das 39 K-Protein stellte, auch bei der Analyse von Proteinen gereinigter Phagenlysate, die prominenteste bande dar. Im S100- wie auch im S30-System wurde es dagegen nicht synthetisiert.

Bei Einsatz von R14-DNA als Matrize in das S100-in vitro-System aus E. coli ergab sich ein völlig anderes Proteilmuster (Abb. 27). Es wurden drei Hauptproteine mit den Molekulargewichten 31.000, 27.000 und 23.000 D synthetisiert. Alle drei Polypeptide ließen sich nicht in Beziehung

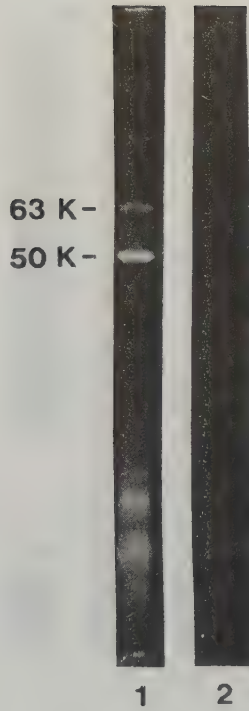


Abbildung 26

R14-DNA-abhängige in vitro-Proteinsynthese im S100-System
aus R. leguminosarum 300

Fluorogramm eines 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gels

Spur 1 S100-System + R14-DNA

Spur 2 S100-System + Tris-Acetat-Puffer

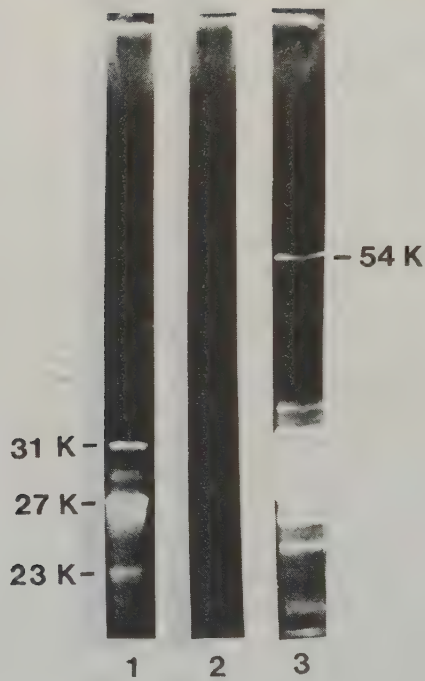


Abbildung 27

In vitro-Proteinsynthese im S100-System aus E. coli
Fluorogramm eines 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gels
(R14-DNA und Col E1-DNA als Matrizen)

- Spur 1 S100-System + R14-DNA
Spur 2 S100-System + Tris-Acetat-Puffer
Spur 3 S100-System + Col E1-DNA

zu den R14-spezifischen Polypeptiden (sowohl von gereinigten Phagenpartikeln als auch aus Infektionsgemischen) setzen. Die unterschiedliche Expression der R14-DNA in den in vitro-Systemen aus E. leguminosarum und E. coli beruhte nicht auf mangelnder Aktivität des E. coli-in vitro-Systems, da bei Zugabe von Col El-DNA als Kontrolle das in der Literatur (Ebina et al., 1979) beschriebene Bandenmuster synthetisiert wurde. (Molekulargewicht der Colizin El-Bande: 54.000 D).

2.3.3 Verschiedene Plasmid- und Phagen-DNA's als Matrizen für das S100-System aus R. leguminosarum 300

Die unter 1.3.4 beschriebenen Plasmid-DNA's wurden als Matrizen in das S100-System aus R. leguminosarum 300 eingesetzt. Analog zu den Versuchen im S30-System war hier jedoch keine in vitro-Genexpression nachweisbar. Auch die Verwendung der DNA des Phagen 11 von E. meliloti 41 als Matrize resultierte nicht in der Synthese von phagen-spezifischen Polypeptiden. Als Kontrollen dienten Col El- und R14-DNA, die im S100-System von R. leguminosarum exprimiert wurden.

E . D i s k u s s i o n

1. Eigenschaften der zellfreien Systeme aus *R. leguminosarum* 300

Die DNA-Abhängigkeit der zellfreien Systeme (S30 und S100) aus *R. leguminosarum* 300 ließ sich durch eine fluorographische Analyse der in vitro-synthetisierten Polypeptide in An- und Abwesenheit von externer DNA überprüfen. Im nicht-präinkubierten S30-System wurden auch ohne Zugabe von DNA einzelne Polypeptide synthetisiert, da der Zellextrakt nicht DNA-frei war. Zur völligen Entfernung der DNA wird in der Literatur die Behandlung mit DNase vorgeschlagen (Moorman et al., 1976).

Das präinkubierte S30- und das S100-System aus *R. leguminosarum* 300 synthetisierten ohne Zugabe von DNA keine Polypeptide, so daß sich auch bei längerer Belichtungszeit auf den Fluorogrammen keine Banden zeigten. Bei Zugabe von DNA zum in vitro-Ansatz wurden dagegen in allen Systemen spezifische Polypeptide synthetisiert. Andererseits ergaben Kontrollversuche ohne DNA-Zugabe auch im S100-System relativ hohe Werte für den Einbau von ³⁵S-Methionin in TCA-fällbares Material (46% des Versuchswerts). Das gelegentliche Auftreten hoher Leerwerte bei in vitro-Systemen aus *E. coli* ist in der Literatur beschrieben (Herrlich und Schweiger, 1974). Die Ursache ist vermutlich das Vorhandensein von mRNA an den Ribosomen. Abhilfe wird durch eine Präinkubation der Ribosomen geschaffen, so daß bei Zugabe von DNA eine Stimulierung des Systems um den Faktor 5-10 erreicht werden kann.

Das S100-in vitro-System aus *R. leguminosarum* 300 erreichte seine maximale Aktivität bei einer Inkubationstemperatur von 29-30°C. Diese Temperatur liegt im optimalen Wachstumtemperaturbereich der meisten Rhizobien (25-30°C, Vincent, 1970). *R. leguminosarum*-Stämme werden normalerweise bei

28°C angezogen (Beringer, 1974). Das Temperaturoptimum des S30-Systems lag ebenso wie das der gereinigten RNA-Polymerase aus R. leguminosarum 300 bei 34°C (Lotz et al., 1981). Die Abweichung von der optimalen Wuchstemperatur erklärt sich möglicherweise dadurch, daß die gereinigten Proteinfraktionen anderen Bedingungen ausgesetzt sind als im Cytoplasma.

Das Temperaturoptimum des S30-Systems wurde anhand der biologischen Aktivität des in vitro-synthetisierten Colizins bestimmt, das des S100-Systems durch Messung des Einbaus von ^{35}S -Methionin in TCA-fällbares Material.

Die unterschiedlichen Optima lassen sich möglicherweise durch die beiden verwendeten Methoden erklären. Während im S100-System die gesamte Proteinsyntheseaktivität gemessen wurde, wurde im S30-System nur der Anteil an enzymatisch aktivem Protein bestimmt. Eventuell wird bei höheren Temperaturen ein größerer Prozentsatz an enzymatisch aktivem Protein relativ zum Gesamtprotein synthetisiert.

Vergleiche mit den nahe verwandten Agrobakterien zeigten, daß aus A. tumefaciens isolierte RNA-Polymerase am aktivsten bei 41°C war (Knopf, 1974), während ein S30-in vitro-System aus A. tumefaciens zwischen 30 und 32°C optimal arbeitete (Kartasova et al., 1981). Agrobakterien wachsen ebenso wie R. leguminosarum am besten im Temperaturbereich von 25-30°C (Beiderbeck, 1977).

In den in vitro-Systemen aus R. leguminosarum 300 wurde der für E. coli gebräuchliche Reaktionsmix verwendet. Die Mg^{2+} -Konzentration wurde hierbei dem Extrakt aus R. leguminosarum 300 angepaßt. Die Konzentration an Mg^{2+} -Ionen hat einen wesentlichen Einfluß auf die in vitro-Genexpression; das Optimum der Konzentration ist von der jeweiligen Matrice abhängig (Fuchs, 1976).

Da die gleichzeitig ablaufenden Transkriptions- und Translationsreaktionen sowie mögliche Protein-Modifikationen oftmals unterschiedliche Mg^{2+} -Optima haben, muß in proteinsynthetisierenden Systemen die Mg^{2+} -Konzentration so eingestellt werden, daß keine Reaktion voll inhibiert wird (Fuchs und Fuchs, 1971).

Das Optimum der Mg^{2+} -Konzentration im S30- und S100-System aus R. leguminosarum 300 lag bei Bestimmung des maximalen Einbaus von ^{35}S -Methionin in TCA-fällbares Material bei 12-13 mM Mg^{2+} . Die fluorographische Analyse der synthetisierten Polypeptide ergab dagegen ein Optimum bei 16-17 mM Mg^{2+} für die in vitro-Synthese von Colizin E1 und Strukturproteinen des Bakteriophagen R14. Da das zweite Kriterium bei der Untersuchung der Genexpression bestimmter DNA's relevanter ist, wurde bei allen in vitro-Versuchen eine Mg^{2+} -Konzentration von 16-17 mM eingehalten.

Im in vitro-System aus E. coli wird die optimale Mg^{2+} -Konzentration für die jeweils zu synthetisierenden Proteine eingestellt (Fuchs, 1976), sie liegt im allgemeinen zwischen 13 und 17 mM (Collins, 1979; Zubay, 1973). Polyamine wie Putrescin und Spermidin können Magnesiumionen teilweise ersetzen (Fuchs, 1976).

Im S30-System aus A. tumefaciens wurde eine Mg^{2+} -Konzentration von 7 mM eingesetzt (Kartasova et al., 1981). Die optimalen K^{+} - und NH_4^{+} -Konzentrationen lagen bei Verwendung von pBR 322-Plasmid-DNA als Matrize bei 60 mM KAc (100 mM im S30-System aus R. leguminosarum 300) und 20 mM NH_4Ac (50 mM im S30-System aus R. leguminosarum 300).

2. Biosynthese von aktivem Colizin El in den zellfreien Systemen aus *R. leguminosarum* 300

Die Synthese von biologisch aktivem Colizin El wurde bereits in einem S30-System aus *E. coli* nachgewiesen (Eichenlaub, 1974). Im S30-System aus *E. coli* wurden insgesamt 18 Col El-DNA-kodierte Polypeptide synthetisiert, von denen 8 mit Antiserum gegen Colizin El reagierten (Ebina et al., 1979). Das größte dieser Proteine (MW 59.000) war Colizin El. Bei den 7 kleineren Polypeptiden handelte es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte oder unvollständig synthetisierte Moleküle des Bakteriozins.

Die Molekulargewichtsangaben für in vitro-synthetisiertes Colizin El schwanken zwischen 56.000 (Chen und Zubay, 1983) und 59.000 D (Ebina et al., 1979). Mit Hilfe der Nukleotidsequenz des Strukturgens wurde ein theoretisches Molekulargewicht von 57.279 D berechnet (Yamada et al., 1982).

Auch die in vitro-Systeme aus *R. leguminosarum* 300 synthetisierten mit Col El-DNA als Matrize Colizin El; es wurde aufgrund seiner spezifischen bakteriziden Aktivität und seines Molekulargewichts identifiziert. Die fluorographische Analyse der insgesamt in vitro-synthetisierten Polypeptide ergab ein Bandenmuster, das dem in der Literatur beschriebenen Muster gleich (Ebina et al., 1979). Neben einer Hauptbande (MW 54.000), die dem Colizin El entsprach, traten mehrere kleinere Proteine auf, verglichen mit dem Bandenmuster aus *E. coli*-Systemen jedoch in sehr viel geringerer Konzentration. Offensichtlich wird das Colizin El-Gen in den in vitro-Systemen aus *R. leguminosarum* 300 bevorzugt exprimiert.

Bindestudien mit RNA-Polymerase aus E. coli haben gezeigt, daß der Promotor des Colizingens der stärkste auf dem Plasmid ist (Collins et al., 1978). Durch Sequenzanalysen der Colizin El-Promotorregion wurden zwei Startstellen der Transkription im Abstand von ca. 80 Basen nachgewiesen. Beide werden bei der in vitro-Transkription genutzt und führen zur Synthese zweier unterschiedlich langer mRNA's (Ebina et al., 1981). Beide Startstellen zeichnen sich durch eine RNAP-Erkennungsstelle 35 bp und die RNAP-Bindestelle (Pribnow-Box) 10 bp vor dem ersten transkribierten Nukleotid aus (Ebina et al., 1981).

Erkennungssequenzen für die Transkription

	-35 Region	-10 Region (Pribnow-Box)
Mustersequenz	TGTTGACA	TATAATG
Col E1 mRNA-1	TCTTGACA	TAGCTTT
Col E1 mRNA-2	TTG	TATAATG

Die Pribnow-Box der mRNA-1 unterscheidet sich in einer Base von der des Lambda-Promotors p_M und des bio B-Promotors von E. coli, die der mRNA-2 stimmt mit der allgemeinen Mustersequenz überein (Rosenberg und Court, 1979).

Die -35 Region der mRNA-1 ist eine Oktamersequenz, die in den meisten Erkennungsstellen vorhanden ist, während bei der mRNA-2 nur die Trimersequenz TTG vorhanden ist. In vivo ist nur die erste Transkriptionsstartstelle aktiv (Yamada et al., 1982), bei der in vitro-Transkription werden dagegen beide Startstellen genutzt, die zweite etwa viermal stärker als die erste (Ebina et al., 1981). Es ist jedoch nur auf der mRNA-1 ein Leseraster vorhanden, das für das Colizin E1-Protein ausreichend lang ist (Yamada et al., 1982; Ebina et al., 1981).

Das erste Nukleotid der mRNA-2 liegt innerhalb der kodierenden Region für Colizin E1, es handelt sich daher bei dem zweiten Transkriptionsstart um einen internen Promotor. Auf der mRNA-2 befinden sich zwar ebenso wie auf der mRNA-1 Sequenzen, die als Ribosomenbindestellen genutzt werden können (Shine und Dalgarno, 1975), aber kein Initiationscodon. Es ist unbekannt, ob der zweite Promotor an der Produktion eines anderen Peptids beteiligt ist (Ebina et al., 1981).

Diese Besonderheit der zwei hintereinander liegenden Promotoren, von denen einer eine etwas unspezifischere RNAP-Erkennungssequenz enthält, könnte Ursache für die effektive Expression des Colizin E1-Gens im R. leguminosarum-spezifischen in vitro-System sein.

3. Expression von Rhizobium-Phagen-DNA in zellfreien Systemen aus *R. leguminosarum* 300

3.1 DNA des Bakteriophagen 11 von *R. meliloti*

Der allgemein transduzierende Phage 11 und der spezifisch transduzierende Phage 16-3 von *R. meliloti* sind eng miteinander verwandt (Mink et al., 1982). Beide Phagen können miteinander rekombinieren und sind homoimmun. Ihre DNA's haben die gleiche Größe (Phage 11: 64,5 kb $\pm$ 5%, von Sik et al., 1980 bestimmt durch Sucrose-Sedimentation; Phage 16-3: 62 kb, von Dorgai et al., 1981 berechnet durch Addition der Molekulargewichte von Restriktionsfragmenten). Das Restriktionsmuster beider DNA's für verschiedene Restriktionsenzyme ist identisch. Heteroduplexversuche mit 16-3- und ϕ 11-DNA ergaben eine Homologie von 99,8 % (Mink et al., 1982).

Für die fünf Hauptstrukturproteine des Phagen 16-3 wurden die folgenden Molekulargewichte nachgewiesen: 86.000, 72.000, 47.000, 31.500 und 18.500 D (Erdei et al., 1982). Bei den beiden erstgenannten Polypeptiden handelt es sich um Schwanz-, bei den folgenden Polypeptiden um Kopfproteine. Mit diesen Werten stimmten die in dieser Arbeit ermittelten Molekulargewichte der in vivo- (87.000, 71.000, 46.000 und 28.000 D) und im S30-System aus *R. leguminosarum* in vitro-synthetisierten Polypeptide (83.000 und 29.500 D) des Phagen 11 weitgehend überein. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wird postuliert, daß sich die beiden Phagen von *R. meliloti* in ihrem Strukturproteinmuster nicht oder nur wenig unterscheiden.

Die Zuordnung der in vitro-synthetisierten Polypeptide zu den Phage 11-spezifischen Strukturproteinen könnte immunologisch erfolgen.

Im S100-System aus *R. leguminosarum* wurde die DNA des Phagen 11 nicht exprimiert. Möglicherweise fehlt in dem gereinigten in vitro-System eine Komponente, die für die Expression der ϕ 11-DNA essentiell ist.

3.2 DNA des Bakteriophagen R14 von *R. leguminosarum* 300

Der Phage R14 von *R. leguminosarum* 300 wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Er hat einen im Grundriß hexagonalen Kopf, einen flexiblen Schwanz und ähnelt morphologisch den Bakteriophagen der Klasse 2 nach Bradley (Bradley, 1967). Seine Nukleinsäure besteht aus doppelsträngiger DNA.

Zur Analyse der Strukturproteine wurden die Phagen über CsCl-Gradienten gereinigt. Dabei ergaben sich zwei größere Fraktionen, von denen die eine komplette Phagen und die andere zum größten Teil Phagenköpfe enthielt, wie durch elektronenmikroskopische Analyse bestimmt werden konnte. Die Fraktion mit den intakten Phagen enthielt hauptsächlich drei Proteine mit den Molekulargewichten 61.000, 46.000 und 39.000 D. Diese Werte stimmen gut mit den Molekulargewichten der Proteine überein, die bei Infektion einer *R. leguminosarum* 300-Kultur mit dem Phagen R14 synthetisiert wurden (81.000, 62.000, 49.000 und 39.000 D). Die Bande mit dem Molekulargewicht 39.000 D war am prominentesten. Die hauptsächlich Phagenköpfe enthaltende Fraktion lieferte im Prinzip ein identisches Proteilmuster, in dem das 39 K-Protein aber sehr viel stärker vertreten war. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesem Polypeptid um ein Kopfprotein des Phagen.

Von der R14-DNA wurden in den in vitro-Systemen aus *R. leguminosarum* 300 in der Regel zwei Hauptproteine mit den Molekulargewichten 59.000 und 51.000 D (S30-System) bzw. 63.000 und 50.000 D (S100-System) synthetisiert. Diese Werte liegen innerhalb des Molekulargewichtsbereichs, der für beide Proteine mit dem jeweiligen in vitro-System ermittelt wurde. Es handelt sich bei beiden Polypeptiden wahrscheinlich um Strukturproteine des Phagen, da ihre Molekulargewichte mit denen von Proteinen aus R14-Lysaten (61.000 und 46.000 D) weitgehend übereinstimmen.

Es ist erstaunlich, daß das 39 K-Protein, das den größten Teil des in vivo-synthetisierten Phagenproteins ausmachte, in vitro offensichtlich nicht synthetisiert wurde. Dieser Befund läßt sich möglicherweise durch einen Vergleich mit der Genexpression des Phagen T7 von E. coli erklären: im Rahmen der frühen Transkription nach T7-Infektion wird das Gen für eine T7-spezifische RNA-Polymerase exprimiert (Schweiger und Herrlich, 1974). Die T7-RNA-Polymerase transkribiert anschließend die späten Gene des Phagen; hierbei handelt es sich fast ausschließlich um Gene für die Phagenstrukturproteine. Möglicherweise benötigt auch der Phage R14 zur Transkription bestimmter Strukturgene (u.a. für das 39 K-Protein) eine eigene RNA-Polymerase, die unter den gegebenen in vitro-Bedingungen nicht synthetisiert wurde oder nicht aktiv war. Durch Einsetzen von Proteinfractionen aus R14-infizierten Zellen im in vitro-System ließe sich prüfen, ob eine R14-kodierte RNA-Polymerase, bzw. R14-spezifische Effektoren an der Expression des 39 K-Protein-kodierenden Gens beteiligt sind.

Bei Verwendung der DNA des Bakteriophagen R14 als Matrize für das S100-System aus E. coli wurden hauptsächlich drei Proteine mit den Molekulargewichten 31.000, 27.000 und 23.000 D synthetisiert. Diese Proteine ließen sich nicht in Beziehung zu den R14-Strukturproteinen setzen.

Die Zugabe einer S100-Präparation aus E. coli zum S100-in vitro-System aus R. leguminosarum 300 hatte keinen Einfluß auf die Expression der Phagen-DNA; es wurde das im Rhizobium-System mit R14-DNA als Matrize übliche Bandenmuster synthetisiert. Durch Einsetzen von RNA-Polymerase bzw. Ribosomen aus E. coli im S100-System aus R. leguminosarum 300 ließe sich prüfen, ob die Expressionsunterschiede zwischen beiden in vitro-Systemen auf verschiedener Erkennung von Transkriptions- oder Translationssignalen beruhen.

4. Expressionsvektoren zur Gen-*in vitro*-Systeme aus *E. coli* und *R. leguminosarum* 300

Als Matrizen für die *in vitro*-Systeme aus *R. leguminosarum* 300 wurden die Vektorplasmide pBR 322 (Bolivar et al., 1977) und pACYC 104 (Crawford et al., 1977), sowie von ihnen abgeleitete Hybridplasmide verwendet. Es handelte sich dabei um die Plasmide pBR2 (Hovryn und Auerel, 1981) und pA 31 (Scott et al., 1981), die klonierte Nifstrukturgene der Nitrogenase von *R. meliloti* bzw. *R. leguminosarum* tragen und um das Plasmid pGV 0340 (Schröder, 1982) mit klonierter DNA des Ti-Plasmids von *A. tumefaciens*.

Keines der aufgeführten Plasmide bewirkte die Synthese spezifischer Polypeptide in den zellfreien Systemen aus *R. leguminosarum* 300.

Die folgende Expression der klonierten Nitrogenase-Strukturgene steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von RNAP-RNA-Bindestudien (Paschke, 1982). Es konnte keine spezifische Bindung der RNA-Polymerase aus *R. leguminosarum* 300 an die *nif*-Promotoren der Plasmide pBR2 und pA 31 nachgewiesen werden.

Das Plasmid pBR 322 kodiert u.a. für die Resistenzen gegen Ampicillin (Genprodukt: β -Lactamase) und Tetrazyklin. Keine Resistenzen werden in einem *300*-System aus *R. coli* exprimiert (Kartasova et al., 1981), das *tc*-Gen allerdings nur sehr schwach im Vergleich zum *ap*-Gen. Im *300*-System aus *E. coli* wurde nur das *ap*-Genprodukt synthetisiert (Wagner, 1982). Das Plasmid pACYC 104 trägt Gene für die Resistenzen gegen Tetrazyklin und Chloramphenicol. Im *300*-System aus *E. coli* wurde nur das Genprodukt des *cm*-Resistenzgens, die Chloramphenicoltransacetylase, synthetisiert (Wagner, 1982).

Ein *300*-System aus *A. tumefaciens* war in der Lage, pBR 322-DNA als Matrize zu verwenden (Kartasova et al., 1981). Die *ap*- und *tc*-spezifischen Genprodukte wurden synthetisiert, allerdings in geringerer Konzentration als im *300*-System aus *E. coli*.

Keine Expression der Antibiotikumresistenzgene des Plasmids pBR 322 erhielt man in einem S30-System aus Rhodopseudomonas sphaeroides (Chory und Kaplan, 1982). Dieses System synthetisierte dagegen bei Zugabe von R. sphaeroides-Phagen-DNA phagenspezifische Proteine.

Zur Übersicht sind die Ergebnisse der in vitro-Genexpression der Plasmide pBR 322 und pACYC 184 in einer Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 7 Expression der Antibiotika-Resistenzgene der Plasmide pBR 322 und pACYC 184 in in vitro-Systemen aus verschiedenen Prokaryonten

	pBR 322		pACYC 184	
	ap	tc	cm	tc
S30-System aus <u>E. coli</u>	+	(+)	n.t.	n.t.
S100-System aus <u>E. coli</u>	+	-	+	-
S30-System aus <u>R. leguminosarum</u>	-	-	-	-
S100-System aus <u>R. leguminosarum</u>	-	-	-	-
S30-System aus <u>A. tumefaciens</u>	+	(+)	n.t.	n.t.
S30-System aus <u>R. sphaeroides</u>	-	-	n.t.	n.t.

Erklärung der Symbole: + = Expression
 (+) = schwache Expression
 - = keine Expression
 n.t. = nicht getestet

Es fällt auf, daß die Resistenzgene des Plasmids pBR 322 in S30-Systemen aus E. coli und A. tumefaciens exprimiert werden, in den in vitro-Systemen aus den mit den Agrobakterien nahe verwandten Rhizobien dagegen nicht.

Als Arbeitshypothese wird eine Barriere der heterospezifischen Genexpression zwischen R. leguminosarum und E. coli auf der Translationsebene postuliert. Hierfür sprechen die folgenden Befunde:

RNA-Polymerase aus R. leguminosarum 300 bindet spezifisch an die folgenden E. coli-Promotoren: den Promotor des β -Lactamase-Gens auf pBR 322, die Promotoren der *tc*- und *cm*-Resistenzgene des Plasmids pRmF2 (Raschke, 1982) und die Promotoren des Phagen T7 (Lotz et al., 1981).

Im zellfreien System aus R. leguminosarum 300 konnten dagegen nur die Col El-Plasmid-DNA und die RNA des Phagen MS2 von E. coli exprimiert werden.

MS2-RNA wird auch von Ribosomen aus Micrococcus cryophilus und Pseudomonas sp. 421 translatiert (Szer und Brenowitz, 1970). Die Phagen-RNA zeichnet sich u. a. dadurch aus, daß sie nicht nur AUG, sondern auch GUG als Initiationskodon der Translation benutzt (Kozak, 1983) und mit unformylierter tRNA initiieren kann (Kersten, 1984).

Die Besonderheit des Colizin El-Gens der Col El-DNA sind zwei hintereinanderliegende Promotoren, die beide in vitro genutzt werden (Ebina et al., 1981). Dieser Spezialfall ist möglicherweise die Ursache für eine verstärkte Transkription des Gens durch die RNA-Polymerase aus R. leguminosarum. Auch eine schwächere Translation als mit Ribosomen aus E. coli würde demnach ausreichen, um nachweisbare Colizinkonzentrationen zu synthetisieren. Für diese Hypothese spricht die Beobachtung, daß bei Einsatz der RNA-Polymerase aus R. leguminosarum in das S100-System aus E. coli das Colizin El-Gen stärker exprimiert wird als bei Transkription durch E. coli-RNA-Polymerase (siehe Abb. 19 A).

Eventuell beruht die Expression des Colizingens im in vitro-System aus R. leguminosarum 300 aber auch auf anderen, bisher nicht bekannten Eigenschaften der Col El-DNA.

Die Komponenten des Translationsapparats der Rhizobien sind bisher nicht untersucht worden. Zur Eindung der 30S-Untereinheit der Ribosomen an die mRNA sind homologe Sequenzen am 3'-Ende der 16S-rRNA und auf der mRNA nötig (Shine und Dalgarno, 1975). Die Basensequenz der 16S-rRNA aus R. leguminosarum ist nicht bekannt. Es wurden aber bereits Unterschiede in den 16S-rRNA's von E. coli, P. aeruginosa, B. stearothermophilus und C. crescentus gefunden (Crunberg-Manago und Gros, 1977). Eventuell weist auch die 16S-rRNA von E. leguminosarum Besonderheiten auf, so daß die Erkennung von Shine-Dalgarno-Sequenzen auf E. coli-spezifischer mRNA erschwert ist.

5. Ausblick

Anschließend an den Aufbau des S100-Systems (diese Arbeit) und die Charakterisierung der RNA-Polymerase aus R. leguminosarum (Lotz et al., 1981; Raschke, 1982; Selbitschka und Lotz, 1984; Zimmermann, 1984) sollten nun die Komponenten des Translationsapparats dieser Bakterien näher analysiert werden. Abgesehen von der Identifizierung einer modifizierten Base (2-Methylthioribosylzeatin) in der tRNA-Fraktion von R. leguminosarum (Cherayil und Lipsett, 1977) liegen keine Informationen hierüber in der Literatur vor. Ein Vergleich mit den ausführlich charakterisierten Ribosomen, Initiationsfaktoren, tRNA's usw. von E. coli könnte zur Aufklärung der Expressionsbarriere zwischen R. leguminosarum und E. coli führen.

Durch die Reinigung der S30- und S100-Systeme aus R. leguminosarum 300 ist es nun möglich, die Rhizobium-spezifische in vitro-Genexpression zu analysieren. Hierfür steht inzwischen eine Cosmid-Genbank der Gesamt-DNA des R. leguminosarum-Stamms B10 zur Verfügung (Tichy und Lotz, 1984). Die Genbank enthält u. a. Klone mit Information für die Nodulation von Leguminosen, die Nitrogenase und die Aufnahmehydrogenase (Richter, 1984). Für Subklonierungen interessanter Klone könnten die Vektorplasmide pBR 322 oder pACYC 184 verwendet werden, da ihre Gene nicht in den in vitro-Systemen aus R. leguminosarum 300 exprimiert werden und somit bei der Analyse der synthetisierten Polypeptide nicht stören.

Im erstellten zellfreien System aus R. leguminosarum können zukünftig in vitro-Regulationsstudien an klonierter Rhizobium-spezifischer DNA in einem homologen System vorgenommen werden. Durch Einsatz von Extrakten aus N₂-fixierenden Bakteroiden im S100-System könnte geprüft werden, ob solche Fraktionen Effektoren für die Expression von Symbiose-spezifischen Genen (z.B. für die Biosynthese der Nitrogenase und

der Hydrogenase) enthalten. Außerdem kann untersucht werden, ob die aus N_2 -fixierenden Bakteroiden isolierte RNA-Polymerase von R. leguminosarum (Zimmermann, 1984) einen regulatorischen Einfluß auf die Symbiose-spezifische Genexpression hat.

F. L i t e r a t u r s t e l l e n

Beiderbeck, R.

Pflanzenumoren. Stuttgart: Ulmer 1977

Beringer, J. E.

R factor transfer in Rhizobium leguminosarum

J. Gen. Microbiol. 84 (1974) 188-198

Beringer, J. E., Johnston, A. W. B., Wells, B.

The isolation of conditional ineffective mutants of
Rhizobium leguminosarum

J. Gen. Microbiol. 98 (1977) 339-343

Beringer, J. E., Hoggan, S. A., Johnston, A. W. B.

Linkage mapping in Rhizobium leguminosarum by means of
R plasmid-mediated recombination

J. Gen. Microbiol. 104 (1978) 201-207

Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. L., Betlach, M. C.,
Heyneker, H. K., Boyer, H. W.

Construction and characterization of new cloning vehicles,
II. A multipurpose cloning system

Gene 2 (1977) 95-113

Bonner, W. M., Laskey, R. A.

A film-detection method for tritium-labelled proteins and
nucleic acids in polyacrylamide gels

Eur. J. Biochem. 46 (1974) 83-88

Bradley, D. E.

Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins

Bacteriol. Rev. 31 (1967) 230-314

Chang, A. C. Y., Cohen, S. N.

Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic mini-plasmid

J. Bact. 134 (1978) 1141-1156

Chen, H.-Z., Zubay, G.

Analysis of Col E1 expression in vitro after chromosome fragmentation

J. Bact. 154 (1983) 650-655

Cherayil, J. D., Lipsett, M. N.

Zeatin ribonucleosids in the transfer ribonucleic acid of Rhizobium leguminosarum, Agrobacterium tumefaciens, Corynebacterium fascians, and Erwinia amylovora

J. Bact. 131 (1977) 741-744

Chory, J., Kaplan, S.

The in vitro transcription-translation of DNA and RNA templates by extracts of Rhodopseudomonas sphaeroides

J. Biol. Chem. 257 (1982) 15110-15121

Clewell, D. B., Helinski, D. R.

Supercoiled circular DNA-Protein complex in E. coli: purification and induced conversion to an open circular DNA form

PNAS 62 (1969) 1159-1166

Collins, J. (1979)

Cell-free synthesis of proteins coding for mobilisation functions of Col E1 and transposition functions of Tn3. Gene 6, 29-42

Collins, J., Johnson, M., Jorgensen, P., Valentin-Hansen, P., Karlström, H. O., Gautier, F., Lindenmaier, W., Mayer, H., Sjöberg, B.

Expression of plasmid genes: Col E1 and derivatives
Microbiology 1978, D. Schlessinger (Ed.) American Society for Microbiology Washington, D. C.

- Crawford, L. V. und Gesteland, R. F.
Synthesis of Polyoma proteins in vitro
J. Mol. Biol. 74 (1973) 627-634
- Dorgai, L., Olasz, F., Berenyi, M., Dallmann, D., Pay, A.,
Orosz, L.
Orientation of the genetic and physical map of Rhizobium
meliloti temperate phage 16-3
MCG 182 (1981) 321-325
- Ebina, Y., Kishi, F., Miki, T., Kagamiyana, H., Nakazawa, T.,
Nakazawa, A.
The nucleotide sequence surrounding the promotor region of
colicin E1 gene
Gene 15 (1981) 119-126
- Ebina, Y., Kishi, F., Nakazawa, T., Nakazawa, A.
Gene expression in vitro of colicin E1 plasmid
Nucl. Acids Res. 7 (1979) 639-649
- Ehring, R., 1983, persönliche Mitteilung
- Ehrlich, S. D., Sgaramella, V.
Barriers to the heterospecific gene expression among pro-
caryotes
TIBS (1978) 259-261
- Eichenlaub, R.
Synthesis of colicin E1 in a cell-free system
J. Bact. 120 (1974) 1476-1477
- Erdei, S., Dudas, B., Orosz, L., Duda, E.
Identification of structural proteins of Rhizobium
meliloti temperate phage 16-3
J. Gen. Virol. 62 (1982) 145-152

Fuchs, E.

The interdependence of magnesium with spermidine and phosphoenolpyruvate in an enzyme-synthesizing system in vitro

Eur. J. Biochem. 63 (1976) 15-22

Fuchs, E., Fuchs, C. M.

In vitro synthesis of T3 and T7 RNA polymerase at low magnesium concentration

FEBS Lett. 19 (1971) 159-162

Grunberg-Manago, M., Gros, F.

Initiation mechanisms of protein synthesis

Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology

Vol. 20 (1977) 209-284

Hansen, J. B. und Olsen, R. H.

Isolation of large plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5

J. Bacteriol. 135 (1978) 227-238

Hayashi, M.

DNA-dependent, RNA-directed protein synthesis

in: Protein Biosynthesis in Bacterial Systems (Herausgeber: J. A. Last und A. T. Laskin)

Marcel Dekker, Inc. New York, 1971

Herrlich, P., Scherzinger, E., Schweiger, M.

Differential influence of spermidin on DNA directed enzyme synthesis in vitro

MGG 114 (1971) 31-34

Herrlich, P., Schweiger, M.

DNA- and RNA-directed synthesis in vitro of phage enzymes

Methodes in Enzymology 30 (1974) 654-669

Hershey, J. W. B., Yanov, J., Johnston, K., Fakunding, J. L.
Purification and characterization of protein synthesis
initiation factors IF1, IF2, and IF3 from E. coli
Arch. Biochem. Biophys. 182 (1977) 626-638

Hirsch, P. R., Van Montagu, M., Johnston, A. W. B., Brewin,
N. J., Schell, J.
Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and
other plasmids in strains of R. leguminosarum
J. Gen. Microbiol. 120 (1980) 403-412

Jaurin, B., Cohen, S. N.
Streptomyces lividans RNA polymerase recognizes and uses
Escherichia coli transcriptional signals
Gene, 28 (1984) 83-91

Jelenc, P. C., Kurland, C. G.
Nucleoside triphosphate regeneration decreases the frequency
of translation errors
PNAS 76 (1979) 3174-3178

Johnston, A. W. B., Beringer, J. E.
Identification of the Rhizobium strains in pea root nodules
using genetic markers
J. Gen. Microbiol. 87 (1975) 343-350

Johnston, A. W. B., Bibb, M. J., Beringer, J. E.
Tryptophan genes in Rhizobium-their organization and their
transfer to other bacterial genera
MGG 165 (1978) 323-330

Kaltschmidt, E., Kahan, L., Nomura, M.
In vitro synthesis of ribosomal proteins directed by
Escherichia coli DNA
PNAS 71 (1974) 446-450

Kartasova, T., Huisman, H., Schilperoort, R.

A coupled transcription-translation system from A. tumefaciens and its application to study Ti plasmid expression in vitro

Nucl. Acids Res. 9 (1981) 6763-6772

Kastelein, R. A., Remaut, E., Fiers, W., van Duin, J.
Lysis gene expression of RNA phage MS2 depends on a frameshift during translation of the overlapping coat protein gene

Nature 295 (1982) 35-41

Kersten, H., 1984, persönliche Mitteilung

Knopf, U. C.

The nucleoside triphosphate-ribonucleic acid nucleotidyl-transferase (E. C. 2. 7. 7. 6) of A. tumefaciens (Smith and Townsend) Conn.

Biochem. J. 143 (1974) 511-520

Kozak, M.

Comparison of initiation of protein synthesis in pro-caryotes, eucaryotes, and organelles

Microbiol. Rev. 47 (1983) 1-45

Layne, E.

Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring Proteins

In Methods in Enzymology, Vol. III, Preparation and Assay of Substrates, Academic Press, New York and London, 447-454

Losick, R., Chamberlin, M. (Hrsg.)

RNA Polymerase, Cold Spring Harbor Laboratory, 1976

- Lotz, W., Fees, H., Wohlleben, W., Burkardt, H. J.
Isolation and characterization of the DNA-dependent RNA
polymerase of Rhizobium leguminosarum 300
J. Gen. Microbiol. 125 (1981) 301-309
- Lowry, O. H., Roberts, N. J., Farr, A. L., Randell, R. J.
Protein measurement with the Folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193 (1951) 265-275
- Männlein-Janecek, E., 1983, persönliche Mitteilung
- Manderschied, U.
Die Bedeutung der dem Initiationscodon 3' benachbarten
Base für die Erkennung der Initiator-tRNA in der bak-
teriellen Proteinbiosynthese
Dissertation 1980 der Technischen Hochschule Darmstadt
- Matthaei, J. H., Nirenberg, M. W.
Characteristics and stabilization of DNase-sensitive
protein synthesis in E. coli extracts
PNAS 47 (1961) 1580-1588
- Mink, M., Orosz, L., Sik, T.
Specialized and generalized transducing rhizobiophage
16-3 and 11 are closely related
FEMS Microbiol. Lett. 13 (1982) 383-387
- Modolell, J.
The S-30 System from Escherichia coli
in: Protein Biosynthesis in Bacterial Systems (Herausgeber:
J. A. Last und A. T. Laskin)
Marcel Dekker, Inc. New York, 1971
- Moorman, A. F. M., Lamie, F., Grivell, L. A.
A coupled transcription-translation system derived from
Escherichia coli: the use of immobilized deoxyribo-
nuclease to eliminate endogenous DNA
FEBS Lett. 71 (1976) 67-72

Münch, M. D., Berg, P.

Preparation of aminoacyl ribonucleic acid synthetases from E. coli

in. Procedures in Nucleic Acid Res.

Hrsg. Cantoni, G. L., Davis, D. R., Verlag Harper und Row
New York 1 (1966) 375-383

Nagahari, K., Koshikawa, T., Sakaguchi, K.

Expression of E. coli tryptophan operon in R. leguminosarum

MGG 171 (1979) 115-119

Nirenberg, M. W.

Cell-free protein synthesis directed by messenger RNA

Methods in Enzymology Vol. VI (1963) 17-23

Pene, J. J., Barrow-Carraway, J.

Initiation of Bacillus subtilis ribonucleic acid polymerase
on deoxyribonucleic acid from bacteriophages 2C, ϕ 29, T4
and Lambda

J. Bact. 111 (1972) 15-23

Petersen, H. U., Danchin, A., Grunberg-Manago, M.

Toward an understanding of the formylation of initiator
tRNA methionine in procaryotic protein synthesis I. In vitro
studies of the 30S and 70S ribosomal tRNA complex
Biochemistry 15 (1976) 1357-1362

Pribnow, D.

Bacteriophage T7 early promoters: nucleotide sequences of
two RNA polymerase binding sites

J. Mol. Biol. 99 (1975) 419-443

Raschke, E.

Elektronenmikroskopische Analyse der Bindung von RNA-Poly-
merasen aus Rhizobium leguminosarum 300 und Escherichia
coli an die nif-Hybridplasmide pSA 31 und pRmR2

Diplomarbeit Erlangen, 1982

Reeve, J.

Use of minicells for bacteriophage-directed polypeptide synthesis

Methods in Enzymology 68 (1979) 493-503

Richter, P.

Suche nach Nodulations-, Nitrogenase- und Aufnahmehydrogenase-Genen in der Genbank von Rhizobium leguminosarum B10 durch DNA/DNA-Hybridisierung

Diplomarbeit Erlangen, 1984

Rosenberg, M., Court, D.

Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription

Ann. Rev. Genet. 13 (1979) 319-353

Ruvkun, G. B. und Ausubel, F. M.

A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes

Nature 289 (1981) 85-88

Schröder, J., 1983, persönliche Mitteilung an W. Lotz

Schweiger, M., Herrlich, P.

DNA-directed enzyme synthesis in vitro

Current Topics in Microbiology and Immunology 65 (1974)

59-132, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York

Scott, K. F., Rolfe, B. G., Shine, J.

Biological nitrogen fixation: primary structure of the Klebsiella pneumoniae nif H and nif D genes

J. Mol. Appl. Genet. 1 (1981) 71-81

Seifert, B. L., Tichy, H. V., Nelson, L. M., Cantrell, M. A., Haugland, R. A., Lotz, W.

Genetic determinants for nitrogen fixation and hydrogen oxidation on the plasmids of Rhizobium leguminosarum

System. Appl. Microbiol. 5 (1984) 270

Selbitschka, W., Lotz, W.

RNA polymerase and symbiotic properties of spontaneous rifampicin-resistant mutants of Rhizobium leguminosarum strains PRE and 300

Symbiotic Nitrogen Fixation (I) 1984, Ghai, B. S. (Hrsg.)
USG Publishers & Distributors, Ludhiana (Indien)

Shine, J., Dalgarno, L.

Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes
Nature 254 (1975) 34-38

Shorenstein, R. G., Losick, R.

Comparative size and properties of the sigma subunits of RNA polymerase from Bacillus subtilis and Escherichia coli
J. Biol. Chem. 248 (1973) 6170-6173

Sidikaro, J. und Nomura, M.

In vitro synthesis of the E3 immunity protein directed by Col E3 plasmid deoxyribonucleic acid
J. Biol. Chem. 250 (1975) 1123-1131

Sik, T., 1981, persönliche Mitteilung

Sik, T., Horvath, J., Chatterjee, S.

Generalized transduction in Rhizobium meliloti
MGG 178 (1980) 511-516

Stallcup, M. R., Sharrock, W. J., Rabinowitz, J. C.

Ribosome and messenger specificity in protein synthesis by bacteria

BBRC 58 (1974) 92-98

- Strycharz, W. A. und Nomura, M.
(Institute for Enzyme Research, Department of Genetics and
Biochemistry, University of Wisconsin, Madison,
Wisconsin 53706)
Coupled in vitro transcription/translation assay system
from *Escherichia coli*
Pers. Mitteilung an W. Lotz (1978)
- Szer, W., Brenowitz, J.
Translation of MS2 RNA by ribosomes from different bacterial
species
BBRC 38 (1970) 1154-1160
- Tichy, H. V., Lotz, W.
Construction of a cosmid gene bank of the hup⁺ Rhizobium
leguminosarum strain B10
System. Appl. Microbiol. 5 (1984) 271
- Traub, P., Mizushima, S., Lowry, C. V., Nomura, M.
Reconstitution of ribosomes from subribosomal components
Methods in Enzymology, Vol. XX (1971) 391-407
- Traub, P., Zillig, W.
Untersuchungen zur Biosynthese der Proteine. VI. Eine neue
Methode zur Darstellung eines zellfreien Systems aus E. coli
und deren Eigenschaften in der nukleinsäureabhängigen
Proteinsynthese
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 343 (1966) 246-260
- Veltkamp, E., Stuitje, A. R.
Replication and structure of the bacteriocinogenic plasmids
Clo DF 13 and Col E1
Plasmids 5 (1981) 76-99
- Vincent, J. M.
A manual for the practical study of the root-nodule bacteria
Oxford & Edinburgh: Blackwell Scientific Publications 1970

Wagner, H.

In vitro-Genexpression der Hybridplasmide pSA 31 und pRmR2
in einem gekoppelten Transkriptions-Translations-System
aus E. coli

Diplomarbeit Erlangen, 1982

Watanabe, Y., Igarashi, K., Hirose, S.

Differential stimulation by polyamines of phage RNA-directed
synthesis of proteins

Biochem. Biophys. Acta 656 (1981) 134-139

Yamada, M., Ebina, Y., Miyata, T., Nakazawa, T., Nakazawa, A.
Nucleotide sequence of the structural gene for colicin E1 and
predicted structure of the protein

PNAS 79 (1982) 2827-2831

Yang, H.-L. und Zubay, G.

Expression of the cel gene in Col E1 and certain hybrid
plasmids derived from EcoRI-treated Col E1

In Microbiology-1978 (Hrsg. D. Schlessinger), American Society
for Microbiology, Washington D. C. (1978) 154-155

Zimmermann, J.

Isolierung und Charakterisierung der RNA-Polymerase aus Bakte-
roiden von Rhizobium leguminosarum B10

Diplomarbeit Erlangen, 1984

Zubay, G.

In vitro synthesis of protein in microbial systems

Ann. Rev. Genet. 7 (1973) 267-287

Anhang:

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A ₂₈₀	: Absorption bei $\lambda = 280$ nm
ap	: Ampicillin
ATP	: Adenosintriphosphat
cAMP	: zyklisches Adenosinmonophosphat
cm	: Chloramphenicol
cpm	: counts per minute
CTP	: Cytidintriphosphat
DEAE-	: Diäthylaminoäthyl-
DNA	: Desoxyribonukleinsäure
DNase	: Desoxyribonuklease
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Äthylendiamintetraacetat
FAD	: Flavin-adenin-dinukleotid
GTP	: Guanosintriphosphat
hup	: hydrogen uptake
IF	: Initiationsfaktor
iv	: in vitro
K	: Kilodalton
kb	: Kilobasenpaare
lac	: Lactose
LM	: low molecular weight mix
M	: Multiplizität
mRNA	: Botenribonukleinsäure
MW	: Molekulargewicht
NADP	: Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
nif	: nitrogen fixation
OD ₂₈₀	: Optische Dichte bei $\lambda = 280$ nm
PEG	: Polyäthylenglykol
ppGpp	: Guanosintetraphosphat
RM	: Reaktionsmix
RNA	: Ribonukleinsäure

RNAP : RNA-Polymerase
RNase : Ribonuklease
rpm : rounds per minute
S30 : Überstand aus einer 30.000xg-Zentrifugation
S100-DE : Überstand aus einer 100.000xg-Zentrifugation, über
DEAE-Cellulose gereinigt
SDS : Natriumdodecylsulfat
tc : Tetrazyklin
TCA : Trichloressigsäure
TEMED : Tetramethyläthylendiamin
Tris : Trishydroxymethylaminomethan
tRNA : Transferribonukleinsäure
trp : Tryptophan
UTP : Uridintriphosphat

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl Mikrobiologie des Instituts für Mikrobiologie und Biochemie durchgeführt.

Für die Überlassung des interessanten Themas, dessen Bearbeitung sich aufgrund technischer Probleme aber oft verzögerte, danke ich Herrn Prof. Dr. W. Lotz.

Frau Hanne Wagner möchte ich für die Überlassung der iv-Komponenten aus E. coli und vor allem für ihre Hilfsbereitschaft und ihr Interesse am Fortgang der Arbeit auch noch nach unserer gemeinsamen Zeit im Isotopenlabor danken.

Herr Hans Fees stellte RNAP-Präparationen aus R. leguminosarum 300 zur Verfügung und half bei ihrer Isolierung.

Frau Dr. E. Männlein-Janecek (Institut für Physiologische Chemie, Erlangen) war mir bei der Durchführung von iv-Translationstests behilflich.

Herrn Peter Franke danke ich für die elektronenmikroskopische Darstellung des Phagen R14.

Herr Prof. Dr. E. Schweizer stellte freundlicherweise den Fermentor des Instituts für Biochemie für die Anzucht der Bakterien zur Verfügung.

Allen Mitgliedern des Instituts danke ich für viele Anregungen und Gefälligkeiten (u. a. zahllose 'Gelplättchen').

Zu besonderem Dank bin ich aber meiner Familie verpflichtet, ohne deren Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Karin Laue-Schuler, geb. Laue

geboren am 3. März 1955 in Höxter/NRW

Schulbildung:

April 1961 - April 1965	Volksschule Lippstadt
April 1965 - Oktober 1965	Gymnasium Lippstadt
Oktober 1965 - Januar 1968	Ricarda-Huch-Schule, Braunschweig
Februar 1968 - Juli 1970	St. Ursula-Gymnasium, Brühl b. Köln
September 1970 - Juni 1973	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Erlangen

Abitur: 8. Juni 1973

Studium:

WS 1973/74 - WS 1979/80 Studium der Biologie an der Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen

Diplom: 21. Januar 1980

Thema der Diplomarbeit: Exo- und Zellwandpolysaccharide von
Rhizobium meliloti

Promotion:

Januar 1980 - Dezember 1980 und Juli 1981 - März 1984 Durchführung des experimentellen Teils der Dissertation am Institut für Mikrobiologie und Biochemie, Lehrstuhl Mikrobiologie der Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen

Arbeitsverhältnisse:

1. 1. 1980 - 31. 3. 1982 Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen

Druck: Copy Center 2000
Obere Karlstraße 30
8520 Erlangen